



# **EFEITO DE UM EXTRATO DE ALGAS NAS ACTIVIDADES DA NITRATO REDUTASE E DA GLUTAMINA SINTETASE EM OLIVEIRA (*OLEA EUROPAEA* L.) 'GALEGA VULGAR' E 'COBRANÇOSA'**

**Rodrigo Rafael Guerreiro Capela**

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em

**Engenharia Agronómica**

Orientador: Doutora Mariana da Silva Gomes Mota

**Júri:**

Presidente - Doutora Cristina Maria Moniz Simões de Oliveira, Professora Associada com Agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Vogais - Doutor Ernesto José de Melo Pestana de Vasconcelos, Professor Catedrático Aposentado do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

- Doutora Maria Odete Pereira Torres, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

- Doutora Mariana da Silva Gomes Mota, Investigadora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Lisboa, 2013

*“Sê humilde para evitar o orgulho, mas voa alto para alcançar a sabedoria”*

*Santo Agostinho*

## **Agradecimentos**

À investigadora Mariana Mota, pelo privilégio de a ter conhecido, como minha orientadora pela sua enorme amizade e infindável paciência, sempre incansável no apoio que me prestou, abdicando por muitas vezes de longas horas do seu tempo pessoal de modo a me prestar atenção e ajuda na elaboração deste trabalho.

À Professora Doutora Cristina Oliveira e ao Professor Doutor Ernesto de Vasconcelos pela sua amizade e grande disponibilidade na escolha deste tema de dissertação.

À Selectis na pessoa do Engenheiro Josué Clemente, por gentilmente ter disponibilizado o produto Goëmar Olivos para a realização do estudo.

Aos Engenheiros João Pedro Soares Lopes e Rui Soares Lopes, da Soares Lopes–Casa Agrícola, pelo espaço disponibilizado para a realização dos ensaios de campo.

Ao meu avô Capela, responsável máximo pelo meu percurso académico, que sempre me acompanhou desde o primeiro dia, inspirando de forma inabalável e constante o seu carinho, amizade e confiança.

Ao meu pai, por ser um enorme entusiasta da agricultura portuguesa, pela sua sempre forte convicção no seu avanço e progresso, pelas longas horas de conversa sobre agricultura e pelo seu inquestionável apoio nesta sinuosa caminhada. À minha mãe pela sua pronta ajuda a todos os níveis, pelo seu interminável afecto sem o qual este percurso seria impossível de se realizar. Um agradecimento ao meu irmão Luís ilustre aspirante a médico veterinário pelos vastos conhecimentos que me concedeu.

Aos meus colegas de laboratório Julian Rodríguez e Diogo Graça que bastante me ajudaram na elaboração deste trabalho, com a sua amizade e auxílio, assim como a sua constante boa disposição tornando mais fácil o trabalho neste estudo.

Aos meus colegas de curso que de diversas maneiras manifestaram o seu interesse e ajuda para que este projecto chegasse a bom porto.

Ao Engenheiro Agrónomo Pedro Trindade, meu colega, amigo e companheiro de curso desde o primeiro dia, pelos muitos momentos de boa disposição que me proporcionou.

Aos meus amigos e antigos colegas que ao longo deste percurso contribuíram com a sua amizade.

## Resumo / palavras-chave

O presente trabalho realizou-se na quinta da Choufarra, localizada na Póvoa de Santarém e visou avaliar os efeitos da aplicação de um bioestimulante com base num creme de algas na actividade enzimática de nitrato redutase (NR) e glutamina sintetase (GS) em duas cultivares de oliveira, a 'Galega' e a 'Cobrançosa'. Este produto é divulgado como melhorador da eficiência da absorção do azoto ao incrementar a actividade da nitrato-redutase, enzima envolvida na assimilação do azoto nítrico. Foi efectuado um único tratamento com o bioestimulante aquando da plena floração e em dose dupla em relação à comummente recomendada pelo fabricante. Durante a floração e vingamento, colheram-se semanalmente amostras de raízes jovens, folhas jovens e órgãos reprodutivos (flores/jovens frutos) de árvores tratadas e não tratadas e doseou-se nestas as actividades da GS e da NR. Em relação à cultivar Cobrançosa, verificaram-se efeitos benéficos da aplicação do produto na actividade da GS em todos os órgãos nas duas últimas datas e na actividade da NR mais generalizadamente nas folhas e órgãos reprodutivos. Na cultivar Galega não se verificaram efeitos benéficos do produto sobre as actividades enzimáticas. A produção foi tendencialmente superior nas árvores das duas cultivares tratadas com o bioestimulante.

Palavras-chave: Nitrato redutase, Glutamina sintetase, *Olea europaea* L., bioestimulante, dose dupla, extracto de algas.

## Abstract

The present work was realized in the farm “da Choufarra”, located in Póvoa de Santarém and aimed to evaluate the effect of the application of a biostimulant based in seaweed extract on enzymatic activities of nitrate reductase and glutamine synthetase in the olive cultivars ‘Galega’ and ‘Cobrançosa’. This product is considered to improve nitrogen assimilation by increasing the activity of nitrate reductase, an enzyme that is involved in assimilation of nitric nitrogen. A single treatment with the double amount of the recommended dose of biostimulant was applied at full bloom. During flowering and fruit set, samples from young roots, young leaves and reproductive organs (flowers or young fruits) of treated trees and non treated trees were weekly harvested and we determine NR and GS activities. In relation to ‘Cobrançosa’, we verified beneficial effects of the product on GS activity in all the organs in last two harvest dates, and in NR activities more generally on leaves and reproductive organs. In ‘Galega’ we did not verify beneficial effects of the product in the enzymatic activities. The production tended to be superior in treated trees in both cultivars.

Key-words: Nitrate reductase, Glutamine synthetase, *Olea europaea* L., biostimulant, double dose, seaweed extract.

## Extended Abstract

The present work was realized in farm “da Choufarra”, located in Póvoa de Santarem at Santarém district. The main activity of this farm is the production of olives for olive oil. The main objective of present work was to evaluate the effects of the application of a biostimulant made with algal cream (Goëmar Olivos – Selectis) on enzymatic activity of nitrate reductase (NR) and glutamine synthetase (GS) on two cultivars of olive tree, ‘Galega’ and ‘Cobrançosa’, that are both very important in Portuguese olive farming.

Among fertilization products, seaweed extracts are recently available to farmers; these products are a natural product, biodegradable and actually offer a rational choice to agriculture. The fertilization is a cultural practice very used in farming that provides improvements in production; however, the abuse in nitrogen fertilization is very frequently causing many problems to environment and economic losses for agriculture. This seaweed extract based product is released as being able to improve nitrogen assimilation by increasing the activity of nitrate reductase, an enzyme that is involved in assimilation of nitric nitrogen. This experimentation involved a single treatment with the double amount of the recommended dose of biostimulant at full bloom. During flowering and fruit set, samples from young roots, young leaves and reproductive organs (flowers or young fruits) of treated and non treated trees were weekly harvested and we determined NR and GS activities. It is probable that this biostimulant product can improve the use of nitrogen, with the increment of activity in nitrate reductase. So the product can improve the efficiency of nitrogen assimilation. We harvested samples on eight trees of ‘Galega’ and in six trees of ‘Cobrançosa’, the harvests occur with a interval of one week within the period from 18-05-12 to 22-06-12 in ‘Galega’ and from 18-05-12 to 08-06-12 in Cobrançosa. From these trees, we applied the biostimulant product on four trees of ‘Galega’ and in three trees of ‘Cobrançosa’. To the remaining trees we did not apply the product for the comparison. After harvesting, the samples were washed, weighted and frozen with liquid nitrogen in laboratory for subsequent analyzes. The obtained results demonstrate that this product doesn’t show beneficial effect in enzymatic activity in both enzymes GS and NR in ‘Galega’ cultivar. However, in ‘Cobrançosa’, we verify beneficial effects on GS activity in the roots, leaves and reproductive organs in last two harvests. Regarding NR, we verify beneficial effects on roots only at first harvest, on leaves in last two harvests and in reproductive organs in first three harvests. So we can conclude that this product has some beneficial effects on ‘Cobrançosa’. The effect of biostimulant product was more pronounced in ‘Cobrançosa’ than in ‘Galega’, because perhaps ‘Galega’ has genetic characteristics like rusticity or strong vigor, these genetic characteristics of “Galega” can determine a minor response of the application product. Olive production was tendentially higher in trees treated with biostimulant both in ‘Galega’ as in ‘Cobrançosa’.

Key-words: Nitrate reductase, Glutamine synthetase, *Olea europaea* L., biostimulant, double dose, seaweed extract.

# Índice

Agradecimentos .....	II
Resumo / palavras-chave .....	III
Abstract .....	IV
Extended Abstract .....	V
Índice .....	VII
Índice de Figuras .....	IX
Índice de Quadros .....	XI
Lista de abreviaturas .....	XII
1. Introdução .....	1
2. Revisão Bibliográfica .....	2
2.1. Taxonomia da oliveira .....	2
2.2. Origem geográfica e domesticação .....	2
2.3. Cultura do olival no mundo e em Portugal .....	2
2.4. Cultivares em estudo .....	4
2.4.1. Galega .....	4
2.4.2. Cobrançosa .....	5
2.5. Condições edafoclimáticas .....	5
2.6. Ciclo biológico da oliveira .....	7
2.6.1. Floração e frutificação .....	10
2.7. Azoto .....	12
2.7.1. Azoto no Solo .....	12
2.7.2. Absorção do azoto pela planta .....	14
2.7.3. Azoto na planta .....	16
2.7.4. Balanço anual do N na planta .....	17
2.7.5. Enzimas do metabolismo do azoto estudadas .....	18
2.8. Bioestimulante .....	22
3. Material e métodos .....	24



3.1.	Características do local de ensaio .....	24
3.1.1.	Características climáticas.....	24
3.1.2.	Características de solos .....	26
3.2.	Material vegetal .....	27
3.3.	Preparação do extrato de material vegetal.....	30
3.3.1.	Quantificação proteica.....	31
3.3.2.	Tratamento estatístico.....	33
3.4.	Avaliação de produção .....	33
3.5.	Resultados.....	34
3.6.	Análise climática .....	34
3.7.	Resultados.....	38
3.7.1.	Cultivar Galega .....	39
3.7.2.	Cultivar Cobrançosa.....	43
3.8.	Produção .....	47
4.	Discussão de resultados .....	48
4.1.	Conclusões.....	55
5.	Referencias Bibliográficas .....	57
Anexo I	.....	64
Anexo II	.....	106

## Índice de Figuras

Figura 1 Ciclo bienal da oliveira (Adaptado de Silva, 2008).....	8
Figura 2 Oliveira em plena floração, pormenor de flor de oliveira fecundada.....	10
Figura 3 Esquema representativo do fluxo (setas) do azoto nos ecossistemas terrestres (adaptado de Miller e Cramer, 2004).....	13
Figura 4 Esquema ilustrativo da absorção e assimilação de $\text{NO}_3^-$ pelas células de plantas (adaptado de Crawford <i>et al.</i> , 2000 citado em Miller e Cramer, 2004).....	19
Figura 5 Classificação climática de Köppen-Geiger na península ibérica (Atlas Climático Ibérico, 2011). ....	24
Figura 6 Gráfico da: Temperatura média das máximas (TA), temperatura média das mínimas (TI), temperatura máxima absoluta mensal (TMA), temperatura mínima absoluta (Atlas Climático Ibérico, 2011).....	25
Figura 7 Gráfico da precipitação máxima diária (PM) e precipitação média mensal (P) no período de 1971-2000 (Atlas Climático Ibérico, 2011). ....	26
Figura 8 Olival onde se realizou o ensaio na quinta da Choufarra.....	27
Figura 9 Curva padrão BSA. ....	31
Figura 10 Curva padrão da NR.....	32
Figura 11 Curva padrão da GS.....	33
<b>Figura 12 Gráfico das temperaturas médias das máximas no período de realização do ensaio.....</b>	<b>34</b>
Figura 13 Gráfico das temperaturas médias das mínimas no período de realização do ensaio. ....	35
Figura 14 Gráfico de comparação de temperaturas médias máximas e mínimas entre a série 71-2000 e 06/2011 a 07/2012.....	36
Figura 15 Temperaturas médias diárias. ....	36
Figura 16 Precipitação no período de 06-2011 a 07-2012.....	37
Figura 17 Comparação de precipitações entre a série 71-2000 e 06/2011 a 07/2012. ....	38
Figura 18 Actividade média das enzimas NR ( $\mu\text{mol}$ de nitrito por $\text{mg}$ proteína total solúvel) e GS ( $\mu\text{mol}$ de glutamyl hidroxamato por $\text{mg}$ proteína total solúvel) ao longo do período estudado para a cultivar Galega nas amostras de raiz. O comprimento das linhas de erro é 2x o erro padrão ( $n=4$ ). Legenda: Raiz C/ - raiz de árvores com bioestimulante aplicado; Raiz S/ - raiz de árvores sem bioestimulante aplicado.....	40
Figura 19 Actividade média das enzimas NR ( $\mu\text{mol}$ de nitrito por $\text{mg}$ proteína total solúvel) e GS ( $\mu\text{mol}$ de glutamyl hidroxamato por $\text{mg}$ proteína total solúvel) ao longo do período estudado para a cultivar Galega nas amostras de folhas. O comprimento das linhas de erro é 2x o erro padrão ( $n=4$ ). Legenda: Folhas C/ - folhas de árvores com bioestimulante aplicado; Folhas S/ - folhas de árvores sem bioestimulante aplicado. ....	40

Figura 20 Actividade média das enzimas NR ( $\mu\text{mol}$  de nitrito por  $\text{mg}$  proteína total solúvel) e GS ( $\mu\text{mol}$  de glutamil hidroxamato por  $\text{mg}$  proteína total solúvel) ao longo do período estudado para a cultivar Galega nas amostras de órgãos florais. O comprimento das linhas de erro é 2x o erro padrão ( $n=4$ ). Legenda: ORG C/ - órgãos florais de árvores com bioestimulante aplicado; ORG S/ - órgãos florais de árvores sem bioestimulante aplicado. .41

Figura 21 Actividade média das enzimas NR ( $\mu\text{mol}$  de nitrito por  $\text{mg}$  proteína total solúvel) e GS ( $\mu\text{mol}$  de glutamil hidroxamato por  $\text{mg}$  proteína total solúvel) ao longo do período estudado para a cultivar Cobrançosa nas amostras de raiz. O comprimento das linhas de erro é 2x o erro padrão ( $n=3$ ). Legenda: Raiz C/ - raiz de árvores com bioestimulante aplicado; Raiz S/ - raiz de árvores sem bioestimulante aplicado. ....44

Figura 22 Actividade média das enzimas NR ( $\mu\text{mol}$  de nitrito por  $\text{mg}$  proteína total solúvel) e GS ( $\mu\text{mol}$  de glutamil hidroxamato por  $\text{mg}$  proteína total solúvel) ao longo do período estudado para a cultivar Cobrançosa nas amostras de folha. O comprimento das linhas de erro é 2x o erro padrão ( $n=3$ ). Legenda: Folha C/ - folha com bioestimulante aplicado; Folha S/ - folha sem bioestimulante aplicado. ....45

Figura 23 Actividade média das enzimas NR ( $\mu\text{mol}$  de nitrito por  $\text{mg}$  proteína total solúvel) e GS ( $\mu\text{mol}$  de glutamil hidroxamato por  $\text{mg}$  proteína total solúvel) ao longo do período estudado para a cultivar Cobrançosa nas amostras de órgãos florais. O comprimento das linhas de erro é 2x o erro padrão ( $n=3$ ). Legenda: ORG C/ - órgãos florais de árvores com bioestimulante aplicado; ORG S/ - órgãos florais de árvores sem bioestimulante aplicado. .45

## Índice de Quadros

Quadro 1 Dados da produção mundial em 1000 T. de azeite (*assinala dados provisórios). Fonte C.O.I.....	3
Quadro 2 Dados da produção em 1000 T. de azeite na U.E. (* assinala dados provisórios). Fonte C.O.I.....	3
Quadro 3 Dados da produção em 1000 T. de azeite em Portugal (* assinala dados provisórios). Fonte C.O.I. ....	3
Quadro 4 Dados de áreas de olival em Portugal (Recenseamento agrícola 2009). ....	4
Quadro 5 Datas de colheita das amostras e respectivos estados fenológicos da cultivar Galega. ....	28
Quadro 6 Datas de colheita e respectivos estados fenológicos da cultivar Cobrançosa. ....	29
Quadro 7 Resumo dos resultados da análise estatística de comparação entre aplicação ou não de bioestimulante na cultivar Galega nas 6 datas amostradas. ( $\alpha= 0,05$ ) (*a cinzento escuro salientam-se os <i>p-value</i> superiores ao nível de significância). ....	42
Quadro 8 Quadro resumo da análise estatística das actividades enzimáticas GS e NR nas diferentes datas de colheita nas amostras tratadas e não tratadas com bioestimulante (C/S) da cultivar Galega (*a cinzento escuro salientam-se os <i>p-value</i> superiores ao nível de significância). ....	43
Quadro 9 Resumo dos resultados da análise estatística de comparação entre aplicação ou não de Bioestimulante na cultivar Cobrançosa (a cinzento-escuro salientam-se os <i>p-value</i> superiores ao nível de significância). ....	46
Quadro 10 Quadro resumo da análise estatística da aplicação de produto nas diferentes datas de colheita da cultivar Cobrançosa (*a cinzento-escuro salientam-se os <i>p-value</i> superiores ao nível de significância). ....	47
Quadro 11 Dados de Produção. ....	47

## **Lista de abreviaturas**

Cu -Cobre

C:N -Relação carbono azoto

C.O.I. -Comité Oleícola Internacional

E.U.A. -Estados Unidos da América

Fe -Ferro

GS -Glutamina Sintetase

U.E. -União Europeia

N -Azoto

NR -Nitrato redutase

NiR -Nitrito redutase

Mg -Magnésio

Mn -Manganês

K -Potássio

Rpm -Rotações por minuto

# 1. Introdução

A olivicultura é um sector da agricultura portuguesa que desde há muito apresenta uma importância muito significativa. A olivicultura tem nos últimos anos evoluído notavelmente quer em reconversão quer em implantação de novos olivais sobretudo no sul de Portugal, mais especificamente no Alentejo. Face a esta evolução, a cultura tem sido alvo de visíveis progressos técnicos a todos os níveis, em depreciação do acompanhamento tradicional. A fertilização é uma prática cultural enormemente utilizada pelos agricultores, proporcionando essencialmente ganhos de produção. Os abusos na fertilização azotada são frequentes, contribuindo para despesas desnecessárias ao olivicultor, levando a prejuízos camuflados na empresa agrícola, derivados de entre outros problemas, das fracas eficiências das fertilizações. O objectivo desta tese pauta-se por aprofundar o tema da fertilização, mais especificamente o efeito da aplicação foliar de um produto bioestimulante (Goëmar Olivos – Selectis) na actividade das enzimas Nitrato Redutase e Glutamina Sintetase no metabolismo do azoto, nas raízes, folhas e órgãos florais de duas importantes cultivares da olivicultura portuguesa, a ‘Galega’ e a ‘Cobrançosa’. Pensa-se que este produto poderá conduzir a uma possível melhoria na utilização do macronutriente principal Azoto, através do incremento da actividade das enzimas anteriormente referidas. Este facto pode apresentar especial interesse em períodos de forte necessidade de nutrientes, especialmente de azoto, como é o caso do vingamento do fruto. A aplicação deste produto pode preencher uma lacuna nos tradicionais programas de fertilização do olival, melhorando os mesmos, se de facto criar condições favoráveis que se traduzam em melhorias significativas no processo de vingamento, o que se reflectirá numa superior eficiência da fertilização com benefícios explícitos quer para o olivicultor quer para o meio ambiente. Tendo em vista ampliar ensaios já realizados nos últimos dois anos vai testar-se o efeito da aplicação de dose dupla do produto à plena floração em duas cultivares ‘Galega’ e ‘Cobrançosa’.

## **2. Revisão Bibliográfica**

### **2.1. Taxonomia da oliveira**

A oliveira (*Olea europaea* L.) pertence à família botânica *Oleaceae*. As plantas desta família são maioritariamente árvores e arbustos, sendo que muitas delas produzem óleos essenciais nas suas flores e frutos (Barranco *et al.*, 1999). Dos 29 géneros desta família, os de relevante interesse económico e agrícola são *Olea*, *Fraxinus*, *Jasminum*, *Forsythia*, *Ligustrum* e *Syringa* (Heywood, 1978 citado em Barranco *et al.*, 1999). Existem cerca de 35 espécies no género *Olea*, todas as espécies de *Olea* possuem  $2n=46$  cromossomas, a *Olea europaea* L. é a única com o fruto comestível (Bandino *et al.*, 2007 citado em Lopes, 2011).

### **2.2. Origem geográfica e domesticação**

A origem da oliveira é muito antiga. O seu cultivo remonta a épocas pré-históricas, tornando-se bastante difícil determinar com elevada precisão o seu percurso ao longo de tantos séculos. São utilizadas e discutidas diversas teses acerca da origem da oliveira e do seu percurso de expansão geográfica. Segundo De Candolle (s.d.) citado em Loussert e Brousse (1980) considera-se que a oliveira é originária da Síria e Irão e a partir destes países expandiu-se para Este e Oeste e por toda a orla do mediterrâneo (Loussert e Brousse, 1980). Poucos foram os povos da antiguidade que não contactaram com a oliveira. Os gregos foram de entre todos os povos da antiguidade os que deram à oliveira maior relevo, considerando-a até como "árvore sagrada". Por influência directa do povo grego, os romanos prestaram também grande culto a esta cultura absorvendo muitas técnicas de cultivo e de utilização dos seus frutos. Actualmente, cultiva-se a oliveira nas mais diversas partes do mundo até aqui nunca ocupadas pela cultura tal como a África do Sul, Brasil, China, Japão e Austrália (Barranco *et al.*, 1999).

### **2.3. Cultura do olival no mundo e em Portugal**

Podemos observar pelos dados no Quadro 1 a produção mundial de azeite no período correspondente às campanhas de 1990/91 a 2011/12. Ao longo das duas décadas registou-se um considerável aumento, mais do que duplicando a produção de azeite neste período de tempo.

No contexto mundial, a U.E. é o maior produtor mundial, representando na média das últimas quatro campanhas 73,6% da produção total mundial, em segundo lugar apresenta-se a Tunísia com cerca de 5,3% e em terceiro lugar a Síria com cerca de 5,2%.

**Quadro 1 Dados da produção mundial em 1000 T. de azeite (\*assinala dados provisórios). Fonte C.O.I.**

90/91	91/92	92/93	93/94	94/95	95/96	96/97	97/98	98/99	99/00	00/01
1453	2206	1811,5	1825	1845,5	1684	2595	2465,5	2402,5	2374,5	2565,5
01/02	02/03	03/04	04/05	05/06	06/07	07/08	08/09	09/10	10/11	11/12*
2825,5	2495,5	3174	3013	2572,5	2767	2713	2669,5	2973,5	3075	3408,5

Na U.E., ao longo das campanhas de 1990/91 a 2011/12, verificamos um aumento progressivo ao longo dos anos com oscilações em algumas campanhas mas, no geral, constata-se um aumento bem marcado da produção, como se pode constatar no Quadro 2. No seio da U.E., em média nas últimas quatro campanhas, a Espanha lidera as produções com 60% do produzido, seguida pela Itália com cerca de 22,1 % da produção e, em terceiro lugar encontra-se a Grécia com cerca de 14,8 %. Portugal no conjunto da U.E. apresenta-se em termos de produção pouco significativo, visto apenas representar 2,6 % do azeite produzido.

**Quadro 2 Dados da produção em 1000 T. de azeite na U.E. (\* assinala dados provisórios). Fonte C.O.I.**

90/91	91/92	92/93	93/94	94/95	95/96	96/97	97/98	98/99	99/00	00/01
993	1718	1391	1359	1371	1403	1754	2116	1706	1878	1940
01/02	02/03	03/04	04/05	05/06	06/07	07/08	08/09	09/10	2010/11	2011/12*
2463	1942	2448	2357	1928	2030	2118	1938	2224	2209	2444

Em Portugal verificamos ao longo das campanhas analisadas alguns picos de produção, no entanto os valores permanecem coerentes, não se observando oscilações de tendência muito significativa (Quadro 3). De entre os vários factores explicativos dos picos ou baixas de produção, podemos referenciar por exemplo os factores climáticos, caso das campanhas de 1990/91, 2002/03 e 2005/06 em que podemos verificar que, devido à seca extrema que se fez sentir, os valores da produção atingiram mínimos nesta série de campanhas.

**Quadro 3 Dados da produção em 1000 T. de azeite em Portugal (\* assinala dados provisórios). Fonte C.O.I.**

90/91	91/92	92/93	93/94	94/95	95/96	96/97	97/98	98/99	99/00	00/01
20	62	22	32,1	32	43,7	44,8	42	35	50	24,6
01/02	02/03	03/04	04/05	05/06	06/07	07/08	08/09	09/10	2010/11	2011/12*
33,7	28,9	31	41	28	47,5	36,3	53,4	62,5	62,9	76



Dados do Recenseamento Agrícola de 2009 presentes no Quadro 4 mostram que Portugal tem cerca de 331.751 ha de olival distribuídos pelas suas principais regiões olivícolas. Podemos referir que é o Alentejo a região que, em termos de área, domina o panorama olivícola nacional. Este facto não surpreende, visto o Alentejo ser a maior região de Portugal. É de considerar que cerca de 96% da produção de azeitona em Portugal tem como destino final à produção de azeite, sendo que apenas 4% é utilizada para produção de azeitona de mesa. É na região Norte que se encontra a maior área de olival com destino a produção de azeitona de mesa. Em Portugal verifica-se uma clara recuperação no que respeita ao consumo de azeite; no início da década de 90 o consumo *per capita* situava-se em 3,3 kg/*per capita*, atingindo actualmente um valor próximo dos 8,0 kg/*per capita* (Azeite, 2012). A nível mundial verifica-se nos últimos 15 anos um crescimento médio de cerca de 2,1% no consumo de azeite. O consumo de azeite na U.E. representa cerca de 63% do consumo mundial, embora o consumo de azeite em países que tradicionalmente não eram consumidores, como os E.U.A. tenha registado um forte aumento. Actualmente os E.U.A. ocupam o terceiro lugar no ranking dos consumidores de azeite (Azeite, 2012). Portugal é um país tradicionalmente exportador de azeite, sendo um dos principais destinos das exportações nacionais o Brasil, representando 65% das nossas exportações. A U.E. em conjunto com a Tunísia foram os principais exportadores a nível mundial.

**Quadro 4 Dados de áreas de olival em Portugal (Recenseamento agrícola 2009).**

Ano 2009	Olival para Azeite			Olival para Azeitona de Mesa	
	Área (ha)	Área (ha)	Quota Regional	Área (ha)	
<b>Portugal</b>	335.841	331.751	100%	4.090	100%
<b>Norte</b>	76.147	73.405	22%	2.742	67%
<b>Centro</b>	61.667	61.422	19%	255	6%
<b>Lisboa e Vale do Tejo</b>	25.540	25.479	8%	61	1%
<b>Alentejo</b>	164.078	163.235	49%	843	21%
<b>Algarve</b>	8.399	8.210	2%	189	5%

## 2.4. Cultivares em estudo

### 2.4.1. Galega

A cultivar Galega é uma cultivar amplamente divulgada em todo o país; apesar de bastante produtiva, não prima pelo rendimento em azeite, que é considerado fraco a médio, oscilando entre os 14% e os 19% (DGADR, 2010). O azeite desta variedade é geralmente pobre em ácido linoleico, como características organoléticas podemos salientar a elevada

finura, o “doce” e suave (DGADR, 2010). A cultivar, apesar de disseminada em todo o país, não é presença assídua no litoral, onde apresenta tendência para a irregularidade na produção, acentuando o fenómeno de alternância já de si bastante característico da variedade. A cultivar Galega apresenta grande resistência à queda dos frutos aquando da colheita por vibração. Contudo, no final do processo de maturação, o desprendimento do fruto torna-se bastante fácil, ocorrendo queda acentuada dos frutos. Apresenta inflorescências de tamanho médio e um elevado número de flores por inflorescência, os botões florais são de tamanho pequeno e apresentam flores supranumerárias. A cultivar Galega expressa-se em exemplares de tamanho mediano ou grande, com ramos e troncos acinzentados de ramificação curta. As folhas são largas e compridas de consistência mole. Os frutos são pequenos de forma elipsoidal, apicalmente pontiaguda e basalmente arredondada e truncada, a cavidade peduncular é pouco profunda. O fruto apresenta cor negra carregada quando maduro e violácea na viragem para a fase final da maturação. Quanto à fitossanidade, é vulnerável à mosca da azeitona e susceptível à gafa, as raízes apresentam boa resistência a fungos do género *Verticillium* (Leitão *et al.*,1986).

#### **2.4.2. Cobrançosa**

Cultivar típica de Trás-os-Montes de arborescência arbustiva, embora esteja amplamente implantada no centro do país, demonstra especial aptidão para a produção de azeite (Leitão *et al.*,1986). Apresenta boa produtividade e um rendimento em azeite mais elevado que a cultivar Galega oscilando este entre os 18% e os 22%, origina azeite frutado e com grande quantidade de antioxidantes, medianamente rico em ácido linoleico (DGADR, 2010). Aprecia solos de elevada fertilidade. A sua baixa resistência ao desprendimento do fruto permite uma colheita por vibração muito eficaz. O fruto desta cultivar não é habitualmente utilizado para conserva. As inflorescências são de comprimento médio ou curto, cada inflorescência apresenta mediano número de flores, os botões florais são pequenos e não possui flores supranumerárias. Esta cultivar apresenta porte pequeno a médio, ramos com pouca rugosidade ou mesmo lisos, esverdeados a acinzentados, são estaladiços e quebradiços. As folhas são compridas e estreitas, pequenas e de rebordo encurvado. O fruto desta variedade é de tamanho médio, de cor vermelho escuro a negra na maturação, exhibe forma apical pontiaguda ou arredondada. Apresenta um mesocarpo com boa consistência, sofrendo poucos danos no transporte (Leitão *et al.*,1986). Esta cultivar é muito resistente à gafa e à mosca da azeitona e pouco sensível ao olho de pavão (DGADR, 2010).

### **2.5. Condições edafoclimáticas**

A cultura da oliveira está tradicionalmente relacionada geograficamente à bacia mediterrânica, logo intrinsecamente ligada ao clima mediterrânico. O cultivo do olival é

próprio dos climas mediterrânicos, visto propiciarem invernos suaves e verões longos, quentes e secos. Temperaturas muito baixas podem provocar danos na oliveira, danos estes tanto mais graves consoante a época em que se fazem sentir e o estado fenológico em que a planta se encontra. Baixas temperaturas aquando da floração tornam-se muito prejudiciais, já quando a planta está em repouso não se verificam muito nocivas. No entanto, a sensibilidade demonstrada pela oliveira ao frio é também função do seu estado nutritivo, estado sanitário, duração e rapidez da descida das baixas temperaturas (Loussert e Brousse, 1980). Apesar da sua moderada sensibilidade ao frio, a oliveira adquire uma resistência ao frio com a descida das temperaturas no outono até entrar na sua fase de repouso. No período vegetativo, as temperaturas óptimas para o desenvolvimento da oliveira estão compreendidas entre os 12 °C e os 22 °C (Loussert e Brousse, 1980). Durante a floração, temperaturas baixas na ordem dos 0 °C podem levar a uma deficiente formação da flor. Acima dos 35 °C, a oliveira abranda o seu metabolismo e recorre ao fecho dos estomas de modo a regular a sua temperatura e evitar perdas maiores de água. Temperaturas superiores a 40 °C provocam uma paragem acentuada no desenvolvimento e por vezes queimaduras na parte aérea da planta (Loussert e Brousse, 1980; Barranco *et al.*, 2008).

Uma das características do clima mediterrânico é a irregularidade e má distribuição da precipitação ao longo do ano. A ausência de precipitação é um factor limitante no respeitante à produção. Apenas com uma precipitação alta se consegue obter boas produções em sequeiro, a irregularidade da precipitação ao longo do ano provoca limitações ao crescimento contínuo da planta. No entanto existem olivais em regiões pluviométricas que variam de 200 mm a 800 mm anuais (Loussert e Brousse, 1980). Devido à má distribuição da precipitação que, como foi referido, é um fenómeno típico do clima mediterrânico, aquando do Outono-Inverno a precipitação é bastante superior às necessidades da oliveira, daí que o excesso de água seja armazenado no solo, constituindo reservas essenciais para posterior utilização na época estival. Porém, diversas vezes estas reservas hídricas não são suficientes, entrando em ação o homem que, actualmente, adoptando um sistema de produção em regadio, tenta assim minimizar os efeitos do clima mediterrânico (García, 2005).

A cultura da oliveira é particularmente sensível à humidade elevada, esta variável é determinante no estado sanitário do olival, pois as doenças criptogâmicas encontram em situações de elevadas humidades condições muito favoráveis ao seu desenvolvimento. A variável climática precipitação está intimamente ligada aos solos onde está implantado o olival. A capacidade de retenção de água pelo solo é um factor determinante no que toca à produção do olival em sequeiro e também em regadio. No que se refere à textura do solo, a

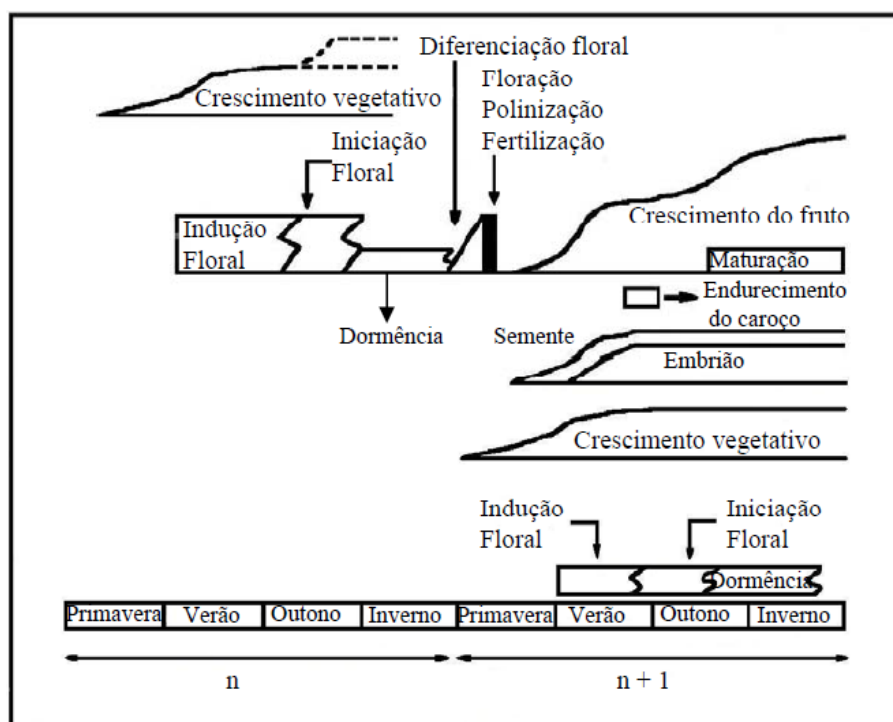
oliveira prefere texturas moderadamente finas do tipo francas, estas texturas possibilitam uma conjugação de bom arejamento e boa capacidade de retenção de água (Milheiro, 1982). Os solos de textura mais grosseira, tal como os solos arenosos, são também bastante adequados a olival, especialmente se o mesmo for de regadio. Um sistema radicular bem desenvolvido propicia no caso da oliveira, e tal como em todas as plantas de porte arbóreo, uma produção mais elevada. Este facto deve-se ao amplo cubo de terra explorado pelas raízes quer em termos de nutrientes quer de água na época estival. A ausência de horizontes impermeáveis é fundamental para o bom desenvolvimento da parte radicular da oliveira (Barranco *et al.*, 1999). A plantação de olivais em vales não é prática comum e pode-se considerar um erro agronómico flagrante, a oliveira é bastante sensível à asfixia radicular e em locais de baixios e vales onde se acumula muita água surgem geralmente problemas de encharcamento, conduzindo por vezes à morte das plantas. Solos com cerca de 1,2 m de profundidade são considerados adequados para a cultura do olival (Barranco *et al.*, 1999). Solos em que a toalha freática se apresente bastante alta podem também provocar danos nas raízes da planta e um deficiente desenvolvimento das mesmas, causando quebras de produção (Barranco *et al.*, 1999). A oliveira possui um grande poder de adaptação no que toca a pH do solo, com valores que oscilam de 5,5 a 8,5 (Barranco *et al.*, 1999). Os solos mais ácidos provocam problemas de toxicidade com alguns elementos e os solos com pH superior a 8,5 apresentam uma estrutura algo deficiente, impedindo uma correcta drenagem (Milheiro, 1982). No entanto, o pH mais aconselhável situa-se ao redor da neutralidade ou ligeiramente alcalino a rondar os 7,5. A salinidade do solo é um factor bastante determinante na produção e sua qualidade. Elevados níveis de sais no solo afectam negativamente a produção, dependendo este decréscimo da variedade em causa. Valores compreendidos entre os 4 dS.m<sup>-1</sup> e 6 dS.m<sup>-1</sup> são valores geralmente tolerados pelo olival, salinidades com valores de 8 dS.m<sup>-1</sup> provocam já uma deficiente absorção de água pelas raízes, afectando também o próprio crescimento da oliveira (Barranco *et al.*, 1999).

## **2.6. Ciclo biológico da oliveira**

O ciclo biológico da oliveira é considerado bienal e está estreitamente relacionado com as condições climáticas a que a cultura está sujeita. O motivo pelo qual se pode classificar de bienal o ciclo da oliveira deve-se ao facto de os processos que conduzem à frutificação necessitarem de dois anos para se completarem como pode ser facilmente observado na Figura 1. O crescimento vegetativo e o desenvolvimento reprodutivo decorrem em simultâneo, provocando por isso uma competição de nutrientes e fotoassimilados nos diversos órgãos da planta.

Como consequência desta competição, em anos de grande produção o crescimento dos raminhos é menor, levando a uma limitação do número de entre-nós e potenciais gomos de floração, comparando relativamente a anos de baixa produção (Barranco *et al.*, 1999). A

oliveira é uma perenifólia que não apresenta verdadeiramente um estado de dormência, existe sim durante o inverno um estado de repouso invernal ao qual se segue um crescimento primaveril bastante activo. Hartmann (1953), citado em Loussert e Brousse (1980) evidenciou que o fenómeno da floração e frutificação são directamente relacionáveis com a quantidade de frio. A quantidade de frio requerido varia também conforme a variedade em causa. As temperaturas inferiores a -12 °C são consideradas o limiar crítico da oliveira, esta temperatura provoca importantes danos em primeiro lugar nas folhas e de seguida nos ramos e troncos (Loussert e Brousse, 1980). Depois do período de repouso invernal, que ocorre de Novembro a Fevereiro, verifica-se um despertar que se manifesta pelo aparecimento de novos lançamentos terminais e abrolhamento de gemas axilares. Entre Fevereiro e Março decorre o fenómeno da diferenciação floral em que as inflorescências acompanhadas respectivamente pelos primórdios das sépalas, pétalas, estames e pistilos se desenvolvem nas gemas axilares. Segundo De Almeida (1940) citado em Loussert e Brousse (1980) a diferenciação floral ocorre cerca de 90 dias antes da floração.



**Figura 1 Ciclo bienal da oliveira (Adaptado de Silva, 2008).**

É em Maio e Junho que, terminado o fenómeno de diferenciação floral, se desenvolvem as inflorescências e tem lugar a floração, visto as temperaturas nesta altura do ano já se apresentarem mais suaves, logo o desenvolvimento dos rácimos florais tem condições favoráveis. A floração decorre nos raminhos que se desenvolveram no ano anterior, no geral produz-se um elevado número de inflorescências e de flores, das quais apenas cerca de 1% a 3% originarão fruto. Quando as condições climatéricas são benéficas,

especialmente humidade sem excessos e temperatura moderada, os grãos de pólen escapam das anteras e são transportados pelo vento até recaírem sobre os estigmas receptivos de flores. A polinização da oliveira é predominantemente anemófila ou seja a dispersão do pólen é realizada pelo vento, esta característica condiciona o sucesso do vingamento, apresentando diferentes níveis de eficácia já que a variedade e as condições climáticas interferem bastante neste processo (Lopes, 2011). As flores dadoras de pólen podem ser da mesma variedade decorrendo daí o caso da autopolinização fenómeno mais raro, ou de variedades diferentes ocorrendo a polinização cruzada, que regra geral, é o meio de se verificar uma boa frutificação. A fecundação cruzada é geralmente melhor sucedida mas, no entanto, requer variedades compatíveis e uma floração simultânea. A duração do período de floração é também dependente das condições climáticas que se verificam após a abertura das primeiras flores, sendo que temperaturas baixas alongam o período de floração e temperaturas altas reduzem o mesmo (Barranco *et al.*, 1999). A simultaneidade do crescimento vegetativo e do desenvolvimento reprodutivo, que caracteriza a oliveira, origina fenómenos de competição para os nutrientes e fotoassimilados entre os diferentes órgãos da planta. O stress hídrico e nutritivo entre a saída do período de repouso invernal e a floração reduzem o número de flores por inflorescência (Barranco *et al.*, 1999). Em pleno Verão, o crescimento vegetativo reduz-se, podendo até mesmo parar devido às elevadas temperaturas. Em situações climáticas favoráveis em Setembro e Outubro pode-se verificar um segundo período de crescimento de raminhos. Após a fecundação, numerosos frutos caem, podendo cair até cerca de 50% dos frutinhos recém formados. Esta queda de frutos é um fenómeno fisiológico que geralmente ocorre em Junho, sendo mesmo designada por queda de Junho. Esta queda alivia a árvore e acelera o crescimento dos frutos que ficam na árvore; condições de humidade e temperatura demasiado adversas podem acentuar a queda de frutos. Após esta queda, está estabelecida a futura produção, uma vez que apenas uma queda accidental após a fecundação ou causa patológicas poderão afectar a produção. Passados alguns dias decorre uma primeira fase de crescimento do fruto que se reflete principalmente no aumento do endocarpo. Nesta fase contribuem para o aumento de tamanho do fruto tanto a divisão celular como a expansão celular, esta fase termina cerca de 7 ou 8 semanas depois da floração. Segue-se depois uma fase em que o crescimento se torna mais lento, podendo mesmo cessar. O endurecimento do caroço é um processo que se inicia primeiramente aquando da ântese, a que se sucede uma lenhificação do mesmo. Na parte final de endurecimento do caroço o crescimento do embrião é bastante acentuado, alcançando o seu tamanho definitivo. A partir de finais de Julho decorre um aumento progressivo das células do mesocarpo, aumentando a rapidez de crescimento do fruto. É neste período que a velocidade de maturação e de formação do azeite nas células aumenta até atingir um máximo em meados de Setembro. Nesta altura a azeitona adquire todas as

suas qualidades organolépticas. Seguidamente, o crescimento da azeitona e a taxa de acumulação de azeite reduzem-se de forma progressiva. É no Outono que o processo de maturação se verifica através da mudança de cor do fruto, essa cor apresenta tendência para o negro ou mais esverdeado conforme a variedade. (Loussert e Brousse, 1980; Barranco *et al.*, 1999)

### 2.6.1. Floração e frutificação

A produção de frutos requer a formação de flores com qualidade e em número suficiente para que ocorra uma boa frutificação. Na oliveira as flores são formadas em inflorescências paniculadas como observado na Figura 2. A floração está dependente do número de inflorescências e do número de flores em cada inflorescência. A qualidade das flores é determinada pela sua fertilidade, na oliveira a expressão da fertilidade tem duas características de importância crucial, o tipo de flor e o desenvolvimento do óvulo (Rapoport *et al.*, 2011). As flores na oliveira são do tipo perfeito ou imperfeito, sendo que apenas as flores hermafroditas perfeitas, ao possuir pistilo, podem formar fruto. As flores estaminadas ou imperfeitas devido ao aborto do pistilo em vários estados de formação, estão apenas capacitadas para produzir pólen.



**Figura 2 Oliveira em plena floração, pormenor de flor de oliveira fecundada.**

A proporção relativa a estes dois tipos de flores não é constante, podendo variar consoante a cultivar, o estado de desenvolvimento da planta e as condições ambientais (Fernandez-Escóbar *et al.*, 2008). Para existir fecundação da flor, o pólen segue o caminho do estigma, que é o lugar onde se deposita até ao saco embrionário, onde ocorre a conversão da flôr em fruto (Fernandez-Escóbar *et al.*, 2008). Para o sucesso na produção do fruto é necessária uma flor perfeita contendo um ovário com pistilo completo. A formação de fruto depende da fertilização do ovário que pressupõe também o desenvolvimento de uma semente a partir de um dos quatro óvulos presentes no ovário. Esta premissa fundamental pode estar condicionada pela ocorrência de óvulos incompletos. Além do referido, podem ainda ocorrer deficiências no saco do embrião, o que pode ainda impedir o

último passo da fertilização no óvulo (Rapoport *et al.*, 2011). A oliveira é uma espécie que tendencialmente favorece a fecundação cruzada, de tal modo que a autoincompatibilidade entre o pólen e o pistilo funciona como um mecanismo de salvaguarda da fecundação cruzada, ou seja, da alogamia. Com o desenvolvimento dos órgãos florais, ocorre na oliveira um fenómeno bastante acentuado de concorrência de assimilados, o que afecta o desenvolvimento dos órgãos florais e a sua capacidade de vingamento. Em anos de floração abundante, em que existe uma grande necessidade de assimilados que não podem ser satisfeitas, surgem situações de necessidades a nível hídrico ou a nível nutricional resultando em problemas no desenvolvimento de inflorescências, flores e ovário (Fernandez-Escóbar *et al.*, 2008). As folhas da oliveira funcionam como estruturas de armazenamento de N, libertando-o quando as necessidades no desenvolvimento reprodutivo e vegetativo assim o exigem. Quantidades insuficientes de azoto afetam negativamente a produção das plantas. Cimato *et al.* (1990) em experimentações levadas a cabo em Itália, verificaram que a fertilização azotada induziu um aumento da frutificação. Também Therios (2006) citado em Erel *et al.* 2008, verificou que a fertilização azotada fomenta a proporção de flores hermafroditas, tendo observado que concentrações menores que 1% de azoto nas folhas levam à formação de flores estaminadas, diminuindo por isso a frutificação. Citado em Erel *et al.* (2008), Therios (2006) constatou também que a deficiência de azoto na planta reduz o número de flores. A deficiência de azoto nas folhas conduz a uma redução de flores por inflorescência (Chatzissavvidis *et al.*, 2004). Erel *et al.*, (2008), num ensaio experimental, apurou que a intensidade da floração está intimamente relacionada com a concentração de azoto utilizada na solução de irrigação utilizada no ensaio. Verificou-se que a intensidade da floração é crescente na medida do aumento da concentração de azoto na solução de rega até determinado pico, iniciando um decréscimo aquando de aumentos na solução posteriores. A frutificação apresenta uma resposta idêntica sendo que, com os sucessivos aumentos, atinge um ponto em que inicia um decréscimo, embora menos acentuado que na intensidade de floração. Estes fenómenos foram também referenciados para as concentrações de N nas folhas, verificando-se um máximo de intensidade de floração aos  $1,29 \text{ mol Kg}^{-1}$  e no que respeita à máxima frutificação um valor bastante próximo de  $1,27 \text{ mol Kg}^{-1}$ .

Tanto a floração como a frutificação são fenómenos de importância extrema na produção final da árvore. Erel *et al.*, (2008), constatou que a produção apresentou um acentuado aumento na medida do aumento das concentrações de azoto, apresentando também um máximo. Quando a oliveira está implantada em territórios de onde estava excluída ou está sujeita a um método de cultura diferente do tradicional, a falta de água durante o desenvolvimento das inflorescências conduz a que a floração seja bastante prejudicada, no sentido em que o número de inflorescências diminui e o número de flores



também se reduz. A quantidade de flores imperfeitas e o desenvolvimento do óvulo são também prejudicados com o défice hídrico (Rapoport *et al.*, 2011).

## **2.7. Azoto**

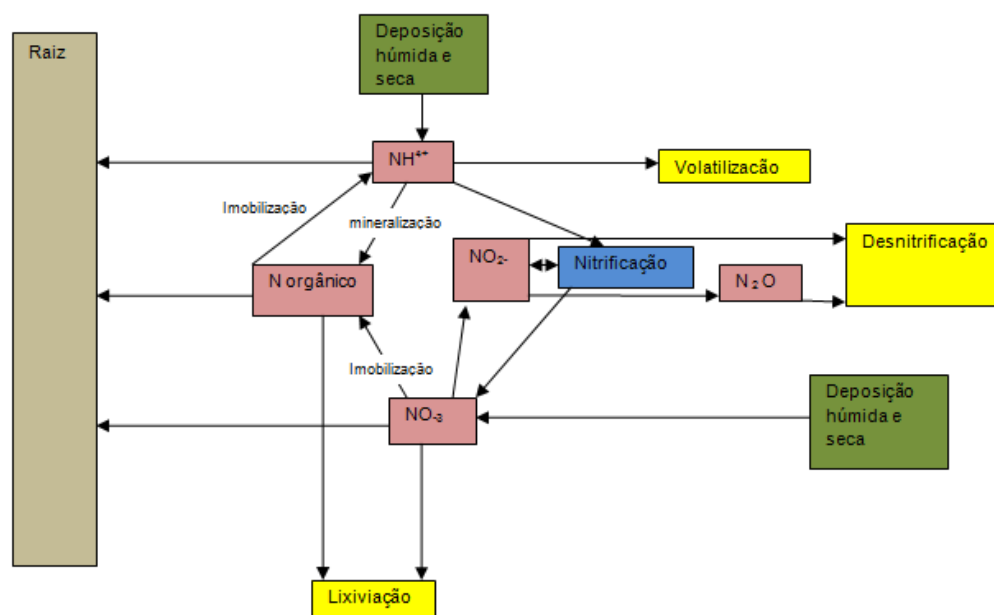
### **2.7.1. Azoto no Solo**

O azoto (N) é um dos elementos mais distribuídos na natureza e é muito móvel, circulando entre a atmosfera, os solos (Figura 3) e os organismos vivos (Mengel e Kirkby, 2001). O N faz parte de inúmeras moléculas orgânicas indispensáveis ao metabolismo e à divisão celular, tais como aminoácidos, nucleótidos, proteínas, ácidos nucleicos, clorofilas e hormonas vegetais (Taiz e Zeiger, 1998). A análise do ciclo biogeoquímico do N revela-nos que este elemento está presente na biosfera em muitas formas, ocupando 78% do volume da atmosfera sob a forma gasosa (sobretudo  $N_2$ , mas também pode ocorrer como amoníaco ( $NH_3$ ) ou óxidos ( $N_2O$  ou  $NO_x$ )). No solo e na água apresenta-se sob formas orgânicas e inorgânicas tais como ião nitrato ( $NO_3^-$ ), ião nitrito ( $NO_2^-$ ) e ião amónio ( $NH_4^+$ ) (Neto, 2007). A forma orgânica do azoto no solo, na sua matéria orgânica representa 98% do azoto, dos quais apenas 1 a 3% é mineralizado em cada ano (Varennnes, 2003). O N inorgânico existente no solo provém, fundamentalmente, da matéria orgânica no solo, do N atmosférico ( $N_2$ ), do N dissolvido na água da chuva ou dos fertilizantes minerais azotados. A quantidade de azoto disponível para as plantas nas formas de ião amónio ou ião nitrato oscila entre 1-100 mg N  $Kg^{-1}$  de solo (Neto, 2007). Ambas as formas inorgânicas de azoto são utilizadas pelas plantas, geralmente é o ião nitrato que predomina no solo, se boas condições de nitrificação se verificarem no mesmo. Em situações muito pontuais, tais como florestas de coníferas, o ião amónio encontra-se em maiores quantidades no solo devido à acção das baixas temperaturas, arejamento insuficiente, elevado teor de matéria orgânica e essencialmente a um pH mais baixo.

O azoto contido na matéria orgânica viva ou morta constitui um enorme reservatório de azoto que é convertido gradualmente a azoto inorgânico através do processo de mineralização. No processo de mineralização, os compostos orgânicos azotados são transformados em ião amónio por diversos fungos, bactérias actinomicetas e protozoários heterotróficos, culminando no processo de amonificação. A mineralização inicia-se com a hidrólise de moléculas grandes em monómeros, como por exemplo dos polipéptidos a aminoácidos. A taxa de mineralização depende das condições a nível climático e pedológico. Os resíduos utilizados, especialmente a sua relação C:N, as práticas culturais praticadas pelos agricultores, tais como a mobilização dos solos entre outros, afectam a taxa de mineralização (Mengel e Kirkby, 2001).

A amonificação é uma etapa no percurso do azoto no solo fundamental e que limita as quantidades de azoto mineral formadas no solo (Varennnes, 2003). A amonificação tem início quando a matéria orgânica liberta azoto na forma de amina (proteínas) e em menor quantidade na forma de bases de ácidos nucleicos terminando com a formação de  $\text{NH}_4^+$  (Mengel e Kirkby, 2001). Condições de solos pobres em colóides e com pH alto assim como temperaturas elevadas conduzem a perdas de  $\text{NH}_4^+$  por volatilização. O ião amónio pode ser adsorvido pelos minerais argilosos do tipo 2:1, este fenómeno designa-se por fixação e impede este ião de estar facilmente disponível para as plantas. O ião amónio apresenta uma pequena mobilidade no solo devido à sua carga positiva, sendo fortemente adsorvido aos minerais de argila que apresentam cargas negativas. Baixas temperaturas e excesso de água no solo conduzem a taxas de amonificação mais baixas.

Bactérias autotróficas utilizam o ião amónio proveniente da mineralização da matéria orgânica, oxidando-o e transformando-o em ião nitrato, este processo designa-se nitrificação. As principais bactérias intervenientes na nitrificação são a *Nitrosomonas* e a *Nitrobacter* que são aeróbias, ou seja apenas vivem em condições de disponibilidade de  $\text{O}_2$  (Varennnes, 2003).



**Figura 3 Esquema representativo do fluxo (setas) do azoto nos ecossistemas terrestres (adaptado de Miller e Cramer, 2004).**

A nitrificação é o único processo acidificante da reacção do solo devido à produção de iões de hidrogénio e que lhes fornece energia e lhes possibilita a fixação de  $\text{CO}_2$ . A nitrificação é um processo que se divide em dois passos distintos. O primeiro passo da nitrificação é a oxidação do ião amónio em  $\text{NO}_2^-$  que por sua vez no segundo passo é oxidado novamente, conduzindo a  $\text{NO}_3^-$ . Os microrganismos nitrificantes são bastante

sensíveis às condições do meio que os rodeia; em solos alagados, ácidos com baixas temperaturas a nitrificação é lenta acumulando-se portanto  $\text{NH}_4^+$  no solo (Mengel e Kirkby, 2001). A nitrificação está assim dependente das variáveis anteriormente enunciadas e também bastante dependente dos níveis de outros nutrientes no solo. A nitrificação cessa a pH de 4,5 e é bastante lenta a pH 6, portanto a reação dos adubos utilizados nos solos, ao afectar a reação do solo, afecta também a taxa de nitrificação. As temperaturas de 20 °C a 30 °C são ideais para a nitrificação, atingindo nestas temperaturas uma taxa máxima. Em solos muito secos a taxa de nitrificação é também reduzida (Mengel e Kirkby, 2001).

### **2.7.2. Absorção do azoto pela planta**

O azoto é maioritariamente absorvido pelas raízes das plantas, embora possa também entrar pela parte aérea através dos estomas e microporos das folhas. Os nutrientes na forma gasosa, especialmente o amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) e dióxido de azoto ( $\text{NO}_2$ ), penetram nos estomas e são rapidamente metabolizados nas células vizinhas. As folhas também libertam amoníaco através dos estomas, especialmente durante a fase de senescência, podendo as perdas por este processo atingir valores bastante significativos. Contudo, na generalidade, as plantas absorvem quase a totalidade do azoto pelas raízes essencialmente na forma de ião nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) e amónio ( $\text{NH}_4^+$ ). A taxa de absorção depende essencialmente da disponibilidade dos iões nitrato e amónio no meio nutritivo do solo. A substituição na absorção de um ião nitrato por um ião amónio acontece frequentemente podendo igualmente suceder o contrário. No entanto a concentração do ião nitrato na solução do solo é geralmente bastante superior devido a acção dos microrganismos do solo no processo de conversão da forma amoniacal a forma nítrica (Varennnes, 2003).

As taxas de absorção do azoto são determinadas essencialmente pelas necessidades fisiológicas da planta, não variando devido à procedência ser um anião ou catião Mengel *et al.*, (1983) citado em (Mengel e Kirkby, 2001). Muitas espécies florestais absorvem preferencialmente o  $\text{NH}_4^+$  em deteriorimento do  $\text{NO}_3^-$  (Marschner *et al.*, 1991 citado em Mengel e Kirkby, 2001). As plantas absorvem em primeiro lugar o  $\text{NH}_4^+$  e, quando este se encontra em menores quantidades, iniciam a absorção de  $\text{NO}_3^-$ . A absorção de amónio está associada a uma diminuição do pH na solução de nutrientes do solo enquanto a absorção do ião nitrato ao seu aumento de pH (Mengel e Kirkby, 2001). A absorção de azoto ocorre geralmente com o movimento de dois protões sujeitos a um baixo gradiente eletroquímico, esta reação necessita de ATP de modo a manter o ciclo do  $\text{H}^+$ -ATPase, ciclo este que é essencial para manter o gradiente de  $\text{H}^+$  através da membrana plasmática (McClure *et al.*, 1990; Meharg e Blatt, 1995; Miller e Smith, 1996 citados em Mengel e Kirkby, 2001). Existem dois sistemas de absorção, um de alta afinidade e outro de baixa afinidade para com o  $\text{NO}_3^-$  que ocorrem com diferentes concentrações externas de  $\text{NO}_3^-$  (Aslam *et al.*, 1992; Glass e Siddiqi, 1995 citados em Miller e Cramer, 2004). Determinadas

proteínas estão associadas à membrana, estão sendo identificadas como possíveis sensores de disponibilidade de azoto no solo, realizando uma importante interface entre a raiz e o solo (Redinbaugh e Campbell, 1991; Forde e Clarkson, 1999 citados em Miller e Cramer, 2004). A absorção do íon amónio é bastante dependente da quantidade de hidratos de carbono na raiz. A assimilação do  $\text{NH}_4^+$  nas raízes depende dos hidratos de carbono translocados dos ramos para as raízes suprimindo as necessidades de energia da reacção na forma de ATP e NADPH (Mengel e Kirkby, 2001). O fornecimento de hidratos de carbono pode ser afectado devido à ocorrência de altas temperaturas, comprometendo por isso a absorção do  $\text{NH}_4^+$  na planta. O  $\text{NH}_4^+$  quando absorvido é rapidamente assimilado em aminoácidos e proteínas, para formar reservas na raiz visto que pequenas quantidades podem levar a fenómenos de toxicidade e acidificação da rizosfera. Já o íon nitrato é absorvido e incorporado em compostos orgânicos, armazenado nas raízes ou translocado pelo xilema até as folhas onde é reduzido (Nicodemus *et al.*, 2008).

A absorção do  $\text{NO}_3^-$  pode ser influenciada pelo fornecimento de  $\text{NH}_4^+$ , aquando do fornecimento de azoto à planta em várias formas, a absorção na forma de  $\text{NO}_3^-$  geralmente decresce. Este facto deve-se principalmente a que, tal como os aminoácidos, o  $\text{NH}_4^+$  encontra-se em forma reduzida, não sendo necessário ocorrer o processo de redução (consumidor de energia), implicando assim menores custos energéticos para a planta. O local onde ocorre a redução do  $\text{NO}_3^-$  tem uma influência determinante nos custos energéticos da planta, a redução do  $\text{NO}_3^-$  nas raízes está associada a uma transpiração devido à maior quantidade de energia consumida pelo processo. (Zogg *et al.* (1996) citados em Nicodemus *et al.*, 2008). Quando a redução do íon  $\text{NO}_3^-$  ocorre nas folhas, a fonte de energia para essa redução é constituída pelos produtos vindos directamente do processo fotossintético (Zogg *et al.*, 1996 e Schrader, 1984 citados em Nicodemus *et al.*, 2008). Logo, uma intensidade luminosa alta permite que a redução do íon nitrato não implique custos muito elevados para a planta. A absorção de  $\text{NO}_3^-$  é favorecida pelo maior estado energético das plantas e aumenta durante o período diurno quando há fotossíntese (Varennnes, 2003). A assimilação de azoto pelas raízes sofre alterações consoante o seu fornecimento à planta de maneira que a quantidade de azoto presente na planta é de algum modo monitorizada pela planta, regulando esta a assimilação (Miller e Cramer, 2004). O tamanho e a arquitectura do sistema radicular das plantas são determinantes na capacidade de absorção de azoto pela planta, as raízes finas apresentam uma maior área de absorção em relação ao volume de solo do que as raízes mais grossas. O tamanho do sistema radicular depende da espécie em causa além de factores físicos, químicos e biológicos. Vulgarmente o tamanho do sistema radicular aumenta quando o azoto é um factor limitante. O local de maior absorção de  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_3^-$  na raiz localiza-se imediatamente antes do meristema da raiz. Os pêlos radiculares têm grande influência na área de absorção das raízes, o seu número, a

quantidade e a localização dos mesmos apresentam uma importância determinante na superfície de absorção (Miller e Cramer, 2004). As plantas beneficiam de uma mistura de ambas as formas de azoto  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$  todavia as concentrações de cada um dos iões variam com a espécie da planta a sua idade, o pH e o seu meio de cultura. Muitas espécies relacionadas e próximas variam na preferência das misturas (Mengel e Kirkby, 2001).

### **2.7.3. Azoto na planta**

O azoto promove um visível incremento na actividade vegetativa da oliveira. Igualmente os fenómenos de floração e frutificação são afectados pelo azoto, de modo a que a boa provisão do mesmo pode aumentar o número de inflorescências, o vingamento, diminuir o aborto do ovário e reduzir a queda dos frutos (Fernandez-Escóbar *et al.*, 2008). Grandes quantidades de nutrientes são exportadas pela produção, pelas folhas e ramos retirados pela poda e pela queda natural das folhas. Daí que, para obtermos uma produção que torne a empresa agrícola sustentável, é necessário repor estas exportações de nutrientes na cultura, de modo a garantir um balanço equilibrado (Erel *et al.*, 2008). No olival e noutras espécies de fruteiras a adubação azotada promove um aumento de produção. No olival este incremento verifica-se no aumento da produção de azeitona. No referente à fertilização azotada, o excesso de azoto pode influenciar negativamente tanto a quantidade como a qualidade da azeitona, ao provocar um desequilíbrio no metabolismo da planta. O excesso de azoto favorece as doenças de origem fúngica, provoca menor resistência às condições climáticas como a seca e as geadas, o excesso deste elemento pode também provocar um atraso na maturação e tornar a mesma irregular (Varennnes, 2003).

As plantas perenes, como a oliveira, diferenciam-se das plantas de folha caduca visto permanecerem em actividade mais tempo que as caducifólias; a oliveira está dotada de órgãos de reserva que lhe permitem suprir as suas necessidades aquando de condições desfavoráveis (Barranco *et al.*, 1999). As plantas lenhosas constituem reservas de azoto nas raízes, na casca dos ramos e troncos. As árvores de folha caduca acumulam reservas de compostos azotados durante o período de crescimento e mobilizam os mesmos para os tecidos lenhosos antes da queda da folha (Fernandez-Escóbar *et al.*, 2004b). Tanto na oliveira como nos citrinos (Moreno e Garcia-Martinez, 1984 e Kato, 1986 citados em Fernandez-Escóbar *et al.*, (2004b), as folhas apresentam-se activas durante mais do que um ano, os compostos nitrogenados, cerca de 60%, são também armazenados na folha, permitindo por isso a acumulação de azoto nas mesmas, funcionando estas como estrutura de armazenamento de azoto na planta (Fernandez-Escóbar *et al.*, 2004b)

As reservas de azoto constituídas na planta são translocadas quando necessário na planta de modo a sustentar o crescimento das mesmas (Fernandez-Escóbar *et al.*, 2008). Na oliveira o fenómeno de safra e contra-safra é um importante factor no respeitante à nutrição da planta, já que a alternância influencia enormemente a dinâmica do azoto e de

outros nutrientes (Fernandez-Escóbar *et al.*, 1999). Em anos de contra-safra após a floração constatou-se um valor mais alto na concentração de azoto do que em anos de safra, o que é perfeitamente lógico. O azoto também é responsável pelo aumento da quantidade de clorofila e da capacidade de assimilação de outros nutrientes (López-Villalta, 1996 citado em Silva, 2010). Segundo Fernandez-Escóbar *et al.*, (2008), nas plantas lenhosas é bem conhecido que a deficiência de azoto reduz o crescimento dos ramos e produz um generalizado sintoma de clorose nas folhas e no que toca ao desenvolvimento reprodutivo, está intimamente relacionada com o aborto do pistilo. A deficiência de N, como anteriormente referido, pode incrementar o aborto do pistilo, contudo, este fenómeno torna-se marginal quando comparado com as características genéticas das variedades ou com o défice de água durante a diferenciação floral em Março (Fernandez-Escóbar *et al.*, 2008). Já o excesso de N não se demonstra a olho nu nem apresenta sintomas na árvore mas conduz a uma excessiva acumulação de N nos frutos o que afecta a sua qualidade, depreciando o produto derivado, ou seja, o azeite (Fernandez-Escóbar *et al.*, 2008). Segundo Williams (1965) citado em Fernandez-Escóbar *et al.*, (2008) a aplicação durante o verão de fertilização azotada estimula a formação do que foi designado pelo autor de “strong flowers”. Williams (1965) citado em Fernandez-Escóbar *et al.*, (2008) verificou que estas flores eram mais vigorosas e apresentavam uma maior longevidade do óvulo, conduzindo por isso a um período de polinização mais alargado. Resultados obtidos anteriormente por Fernandez-Escóbar *et al.*, (2008) sugerem que a deficiência de água antes da floração em conjunto com baixos valores de N na planta provoca uma redução do tamanho do ovário. A quantidade de N afecta também claramente a longevidade dos óvulos, sendo que o seu excesso ou a sua deficiência a alteram negativamente, apenas níveis adequados de N são benéficos para a longevidade do óvulo, proporcionando um atraso na senescência do mesmo e contribuindo para um incremento do fenómeno de frutificação (Fernandez-Escóbar *et al.*, 2008). As concentrações de N nas folhas são geralmente apontadas para baixas quando em valores de (0,98-1,32%), adequadas (1,43-1,57%) e elevadas para (1,69-1,93%) para folhas colhidas em Julho (Fernandez-Escóbar *et al.*, 2008).

#### **2.7.4. Balanço anual do N na planta**

Ao longo do ciclo biológico da oliveira diversos órgãos estão em desenvolvimento ou em repouso, o que conduz a oscilações nas necessidades de azoto e outros nutrientes, no decurso do ciclo cultural. A oliveira é uma espécie perenifolia bastante alternante, este fenómeno pode influenciar a quantidade de nutrientes minerais e o seu consumo anual.

As concentrações de azoto no olival são altas e estáveis durante o inverno, geralmente de Outubro a Março. No início de Abril a concentração de azoto inicia uma marcada fase de decréscimo. O marco do início do decréscimo na concentração do azoto verifica-se com a rebentação dos gomos, início do crescimento vegetativo e a actividade

reprodutiva. Na medida que avança o crescimento vegetativo e o desenvolvimento reprodutivo a concentração do azoto decresce, atingindo um mínimo nos meses de Junho, Julho e Agosto, o que coincide com o início do desenvolvimento dos frutos. As necessidades máximas de azoto na oliveira verificam-se desde a diferenciação dos gomos em Fevereiro-Março até ao vingamento do fruto em Maio-Junho e num segundo pico de necessidade no período de endurecimento do caroço em Julho-Agosto. A floração e o vingamento exigem as maiores quantidades deste nutriente visto que simultaneamente a estes dois fenómenos fisiológicos, ocorre também um processo de crescimento dos novos raminhos que no ano seguinte suportarão a próxima produção. Utilizando a análise foliar como método de diagnóstico da evolução do teor de azoto nas folhas, podemos referir que o teor deste nutriente desce regularmente desde o início da rebentação até atingir um mínimo no período de endurecimento do caroço. Por vezes, este mínimo pode-se verificar mais tarde em Setembro ou Outubro, este atraso pode dever-se à falta de humidade no solo. Quando se inicia o repouso invernal verifica-se um aumento do teor foliar de azoto geralmente inferior ao do ano anterior. No período antecedente à colheita, quando as produções são elevadas, as concentrações de azoto na folha podem baixar.

## **2.7.5. Enzimas do metabolismo do azoto estudadas**

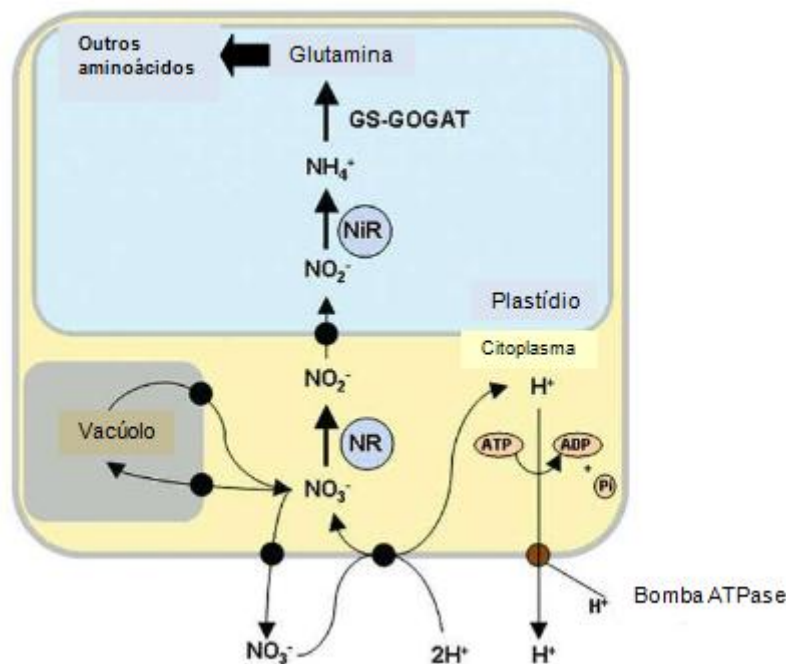
### **2.7.5.1. Nitrato redutase**

A assimilação de nutrientes, particularmente do azoto, requer uma complexa série de reações bioquímicas que se apresentam como das mais dispendiosas energeticamente de entre as reações que ocorrem nos organismos vivos. O ião nitrato não é assimilado directamente em compostos orgânicos. Portanto ocorre um processo de assimilação de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) em que primeiro sucede a conversão do mesmo para nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) e finalmente para amónio ( $\text{NH}_4^+$ ), todo este processo consome o equivalente de 12 ATPs por molécula de azoto.

A enzima Nitrato Redutase (NR) e a Nitrito Redutase (NiR) são as enzimas que catalizam todo este processo, sendo que a NR interfere na reação no primeiro passo de redução do azoto, ou seja, na passagem de nitrato a nitrito e a NiR na segunda fase, ou seja, reduz o nitrito a amónio como esquematizado na Figura 4: O processo de redução de nitrato a nitrito ocorre no citoplasma. A reação pode ser descrita da seguinte forma:



A Nitrato Redutase (NR) é uma flavoproteína de elevado peso molecular, composta por duas subunidades idênticas, cada uma com 100 kDa de massa molecular. Cada unidade contém três grupos prostéticos, FAD (flavina-adenina-dinucleótido), heme e molibdénio (Miller e Cramer, 2004; Marschner *et al.*, 1991).



**Figura 4** Esquema ilustrativo da absorção e assimilação de  $\text{NO}_3^-$  pelas células de plantas (adaptado de Crawford *et al.*, 2000 citado em Miller e Cramer, 2004).

A NR é a proteína que, em tecidos vegetativos, maior quantidade de molibdénio contém. A absorção de  $\text{NO}_3^-$  é regulada por toda a necessidade da planta via sinais derivados dos ramos e transportados através do floema até as raízes. Estes sinais em relação às quantidades de azoto na planta estão relacionados com as concentrações de aminoácidos no floema, mais especificamente a glutamina (Miller e Cramer, 2004). A absorção do  $\text{NO}_3^-$  e a actividade da NR estão intimamente relacionadas, o  $\text{NO}_3^-$  funciona como sinal primário, secundariamente outros factores são de extrema importância tais como a luminosidade, os produtos finais do processo de assimilação, e o ritmo circadiano (Rothstein e Sivasankar 1999 citado em Miller e Cramer., 2004). A NR é induzida em primeiro lugar pelo seu substrato, ou seja, o  $\text{NO}_3^-$ , a indução desta enzima pode verificar-se bastante rapidamente, necessitando apenas de alguns segundos e pequenas concentrações de substrato para ocorrer. A expressão genética no tabaco (*Nicotiana tabacum*) foi alterada pelo fornecimento de  $\text{NO}_3^-$  com valores de actividade da NR muito baixos, funcionando o  $\text{NO}_3^-$  como molécula de sinal. Ao serem deslocadas plantas para condições de luz reduzidas verifica-se uma redução acentuada da actividade da NR, mesmo em condições de quantidades adequadas de nitrato (Miller e Cramer, 2004). Nas folhas, a actividade da NR está bastante dependente do fornecimento de oxigénio, da luminosidade e logo da capacidade fotossintética na fixação de  $\text{CO}_2$ , síntese de sacarose (Kaiser *et al.*, 1999 citado em Mengel e Kirkby, 2001). Segundo Geiger *et al.*, 1998; Scheible *et al.*, 1997b, 2000 citados em Miller e Cramer, (2004), a actividade da NR cresce durante a primeira parte do



dia, decrescendo depois na segunda parte do dia. Em toda a folha, a concentração de  $\text{NO}_3^-$  e provavelmente no vacúolo decresce durante o dia recuperando durante a noite. Durante a primeira parte do dia, a redução de  $\text{NO}_3^-$  é sensivelmente duas vezes mais rápida do que a assimilação do  $\text{NO}_3^-$ . Com o decorrer do dia, a actividade da NR começa a diminuir, já no que toca ao  $\text{NO}_3^-$  a sua absorção e transporte permanecem num ritmo elevado, logo o  $\text{NO}_3^-$  começa a acumular-se nas folhas da planta (Miller e Cramer, 2004). O vulgar fenómeno de acumulação de nitratos nas plantas deve-se sobretudo a ausência de luminosidade e a uma diminuição de poder redutor na planta. O estado de nutrição mineral nas plantas é também um factor de relevância na assimilação do nitrato. Particularmente o molibdénio, sendo um constituinte da NR, desempenha no que toca ao aspecto da nutrição um papel preponderante. A redução do nitrato pode ocorrer nas raízes ou nas folhas, dependendo de vários factores, tais como a espécie em causa, a provisão de nitratos na raiz e o estado de desenvolvimento de uma determinada planta. Segundo Van Egmond e Breteler (1972) citado em Mengel e Kirkby, (2001), a NR apresentou máxima actividade nas folhas jovens da beterraba (*Beta vulgaris* L.), sendo esta actividade cerca de 10 vezes mais intensa do que a verificada em folhas jovens. Segundo Hewitt (1970), a actividade da NR tende a ser superior nas folhas mais jovens. Nas raízes, segundo Hewitt (1970) citado em Mengel e Kirkby, (2001), também nos tecidos mais novos a actividade da NR é superior e é marcada por um declínio expressivo nas partes radiculares mais velhas. Em inúmeras espécies, quando para as raízes está disponível pequenas quantidades de nitrato, este é reduzido nas raízes, já quando a disponibilidade de nitrato aumenta, uma maior parte do mesmo nitrato absorvido é translocado para os ramos e assimilado nos mesmos (Marshner, 1995). Como anteriormente referido, o local de redução do  $\text{NO}_3^-$  está bastante dependente da espécie, Yoneyama e Kumazawa, (1975) e Mata *et al.*, (2000) citados em Miller e Cramer, (2004) verificaram que a redução do  $\text{NO}_3^-$  se dava na raiz, já Lewis *et al.* (1982), Ashley *et al.* (1975) citados em Miller e Cramer (2004), observaram que, no caso da cevada (*Hordeum vulgare* L.) e do milho (*Zea mays* L.), a redução e assimilação do  $\text{NO}_3^-$  ocorria predominantemente nos lançamentos. Como consequência da redução nos lançamentos, consideráveis quantidades de  $\text{NO}_3^-$  são acumuladas e transportadas no fluxo xilémico. A translocação do  $\text{NO}_3^-$  das raízes via xilémica para os lançamentos depende da concentração externa do  $\text{NO}_3^-$  (Oaks, 1986 citado em Miller e Cramer, 2004). A salinidade provoca também uma alteração na absorção de azoto logo interfere também na actividade da NR. As quantidades de NR presentes nas raízes e nos lançamentos são variáveis, no entanto, as plantas mais herbáceas apresentam uma actividade da NR mais intensa nos lançamentos do que nas plantas mais lenhosas que por sua vez apresentam uma maior actividade nas raízes (Pearson *et al.*, 2001 citado em Miller e Cramer, 2004).

### 2.7.5.2. Glutamina sintetase

A Glutamina sintetase (GS) é uma enzima cuja massa molecular é de 350 kDa, esta enzima é composta por oito subunidades idênticas entre si. A sua principal incumbência é a de catalizar a reação de assimilação de  $\text{NH}_4^+$  em glutamina, utilizando o glutamato como substrato. O  $\text{NH}_4^+$  absorvido é rapidamente convertido em aminoácidos e proteínas, sendo estes armazenados nas raízes pois pequenos níveis deste catião podem causar toxicidade à planta, assim como a acidificação da rizosfera. A GS mediante a adição de ATP ao glutamato produz glutamina, sendo que a glutamina oxoglutarato aminotransferase (GOGAT) cataliza por sua vez a transferência de um grupo amido da glutamina para 2-oxoglutarato produzindo duas moléculas de glutamato (Miller e Cramer, 2004; (Mifflin e Habash, 2002). A GS cataliza tanto nas folhas como nas raízes a reação seguinte (Figura 4):

$$\text{Glutamato} + \text{NH}_4^+ + \text{ATP} \longrightarrow \text{glutamina} + \text{ADP} + \text{Pi}$$

Esta reacção requer a hidrólise de uma molécula de ATP, molécula esta fornecida pela fotofosforilação fotossintética, e envolve um cofactor que é um catião bivalente, tal como o  $\text{Mg}^{2+}$ , o  $\text{Mn}^{2+}$  ou o  $\text{Co}^{2+}$ . A ação da GS está directamente relacionada com o estado de desenvolvimento da planta, meio ambiente a que a planta está sujeita, o seu estado metabólico nos seus diversos tecidos. A luz, a quantidade de carbono na planta e a sua relação C/N e o estado nutritivo da planta, especialmente em relação ao azoto, são factores que amplamente influenciam a actividade da GS (Mifflin e Habash, 2002). Diversos estudos indicam que a GS está amplamente distribuída na planta ocorrendo em duas grandes formas. Estas duas formas de GS estão situadas uma no citoplasma e a outra nos plastídios da raiz ou nos cloroplastos. A forma de GS situada no citoplasma produz glutamina para o transporte intracelular do azoto. A forma citosólica, que normalmente se encontra preferencialmente nos tecidos vasculares das folhas, é regulada pela fosforilação e interação com proteínas. O estado fosforilado da GS altera-se conforme seja dia ou noite nas folhas em senescência. Este mecanismo é característico das enzimas envolvidas na assimilação do azoto (Miller e Cramer, 2004). A forma dos plastídios da GS está amplamente distribuída no cloroplasto, sendo geralmente considerada uma forma universal. A sua maior função passa pela reassimilação do  $\text{NH}_3$  originado pela fotorrespiração. A forma dos plastídios da GS está também presente nas raízes e noutros tecidos sem clorofila. A disposição desta forma varia imenso em função dos subtipos de plastídios e das espécies vegetais (Mifflin e Habash, 2002). Existem grandes diferenças entre espécies de plantas na sua capacidade de assimilarem  $\text{NH}_4^+$ , nas raízes, no entanto, a actividade da GS pode ser reprimida aquando de grandes aplicações de Azoto (Schjoerring *et al.*, 2002).

## 2.8. Bioestimulante

De entre a enorme panóplia de produtos fertilizantes que actualmente existe à disposição dos agricultores, surge um novo tipo de produto, distinto dos tradicionais, que procura preencher uma lacuna na ampla lista de produtos fertilizantes de aplicação foliar, os bioestimulantes. É de realçar o facto de que, sendo os bioestimulantes produtos naturais e biodegradáveis, são actualmente uma escolha racional que pode conduzir a uma agricultura mais sustentável.

Durante séculos, as áreas agrícolas próximas de zonas costeiras utilizaram algas como valiosa fonte de matéria orgânica para variados tipos de solos e para muitas culturas. Em variadas culturas, a utilização de extratos de algas proporcionou incrementos na produção e na sua qualidade, além de facultar uma melhoria na absorção de elementos nutritivos inorgânicos do solo, reduzir a incidência de ataques de fungos e insectos, na medida que promovem mecanismos de resistência natural a doenças (Berlyn e Russo, 1990 citados em Chouliaras *et al.*, 2009). Os produtos bioestimulantes contêm reguladores de crescimento, tal como auxinas, citocininas e giberelinas, aminoácidos e elementos inorgânicos que influenciam o crescimento celular, nutrição, maturação (Williams *et al.*, 1981 e Zodape, 2001 citados em Chouliaras *et al.*, 2009). Os bioestimulantes contêm elementos que estimulam o metabolismo das poliaminas. Por esse meio actuam dando “assistência” ao desenvolvimento de flores e seus componentes, de modo a incrementar a capacidade reprodutiva e a resistência dos órgãos reprodutivos em ocasiões de stress. Estes factos foram comprovados para a cultura do algodão (Kelly *et al.*, 2006). Os efeitos do uso destes produtos podem ser variados, várias culturas parecem demonstrar respostas mais marcadas ao uso de extratos de alga *Ascophyllum nodosum*, de entre estas espécies podemos referir o tomate (*Solanum lycopersicum*), a macieira (*Malus pumila*), uva de mesa (*Vitis vinifera* L.) e cerejeira (*Prunus avium*). Num ensaio em que se testaram os efeitos do extrato de alga *Ascophyllum nodosum* na qualidade e na produção de uvas sem grainha “Thompson seedless” numa série de 3 anos, foi observado pelos autores que o extrato proporcionou um significativo incremento na produção total e na qualidade (Norrie *et al.*, 2006). Foi demonstrado também que a integração da aplicação do extrato de algas num plano de fertilização da cultura, neste caso uva de mesa, pode ser ainda mais benéfico. Chouliaras *et al.* (2009) numa experiência com kiwi (*Actinidia deliciosa*) constataram que a aplicação foliar de um extrato de algas de *Ascophyllum nodosum* L. incrementou o tamanho dos frutos e proporcionou um avanço na maturação de cerca de 10-15 dias. Resultados idênticos foram obtidos por Fornes *et al.*, (2002) citados em Chouliaras *et al.*, (2009) aquando da aplicação do extrato de algas de *Ascophyllum nodosum* L. em “clementinas” mandarin e laranjas “Navelina”, o calibre aumentou e registou-se avanço da maturação. No respeitante à nutrição, numa experiência de Turan e Kose (2006) citados em Chouliaras *et al.*, (2009), a

aplicação de um bioestimulante de extrato de algas à vinha conduziu a um aumento de concentrações de K, Fe e Cu. É sugerido pelos autores do estudo que a influência do extrato de algas na absorção de Cu traz consequências positivas na permeabilidade da membrana das células, na actividade enzimática referente à respiração celular e fotossíntese. O estudo de Chouliaras *et al.*, (2009) debruçou-se também sobre a aplicação em oliveira e a qualidade do azeite, avaliando a mesma consoante a aplicação ou não aplicação de extrato de algas; concluiu-se que nas amostras com aplicação de extrato, o azeite apresentou menor acidez, não tendo evidenciado interferência no que toca aos fenóis totais. Após a aplicação de extratos de algas num programa de fertilização que se propunha avaliar as possíveis interferências dos extratos de algas em oliveiras da cultivar Koroneki, levada a cabo por Chouliaras *et al.*, (2009), verificou-se um aumento das concentrações foliares de K, Fe e Cu, já no respeitante ao Mn as suas concentrações nas folhas baixaram. Em relação à produção, neste estudo verificou-se um aumento da mesma em conjunto com uma maturação mais rápida quando, além do extrato de algas, se procedeu também a aplicação de boro, sem que se demonstrassem efeitos no peso total da produção.

O bioestimulante utilizado no ensaio que a seguir se efectuou apresenta-se com o nome comercial de Goëmar Olivos (Selectis) e está à disposição dos olivicultores no mercado de produtos de aplicação foliar em fruticultura. O Goëmar Olivos (Selectis) é um creme de algas de origem natural que contém GA14 além de alguns nutrientes: Boro 26 g/L Magnésio 36 g/L e Enxofre 72 g/L. De acordo com o fabricante, quando aplicado no olival, este creme de algas proporciona fisioactivadores à planta de modo a melhorar a absorção dos nutrientes pela raiz, estimula a translocação de elementos nutritivos para os locais de crescimento mais activo e também o aumento da produção de poliaminas, favorecendo o processo de floração. As poliaminas mais importantes são a putrescina, a espermidina e a espermina, compostos naturais presentes nas plantas, que estão envolvidos nos processos de crescimento e desenvolvimento das mesmas. A influência das poliaminas na melhoria da frutificação foi observada na macieira e na pereira, em especial a putrescina melhora a fecundação e atrasa a senescência do óvulo, sem afectar a produção de etileno pela flor. A aplicação de putrescina em pêras da variedade “Comice” incrementou a longevidade dos óvulos e também o conteúdo em N nas flores (Cristoso *et al.*, 1992 citado em Fernandez-Escóbar *et al.*, 2008). As poliaminas reduzem as taxas de senescência nos tecidos de algumas plantas devido ao antagonismo com o etileno (Galston e Kaur-Sawhney, 1995 citados em Franco-Mora *et al.*, 2004). A melhoria na absorção de nutrientes é defendida pelos produtores do bioestimulante, a Goëmar afirma que este bioestimulante contém uma substância designada manitol que incrementa a actividade enzimática de uma enzima fulcral no metabolismo de assimilação do azoto, a Nitrato Redutase. Além desta enzima, também as fosfatases, enzimas necessárias para a absorção de fósforo registaram um aumento

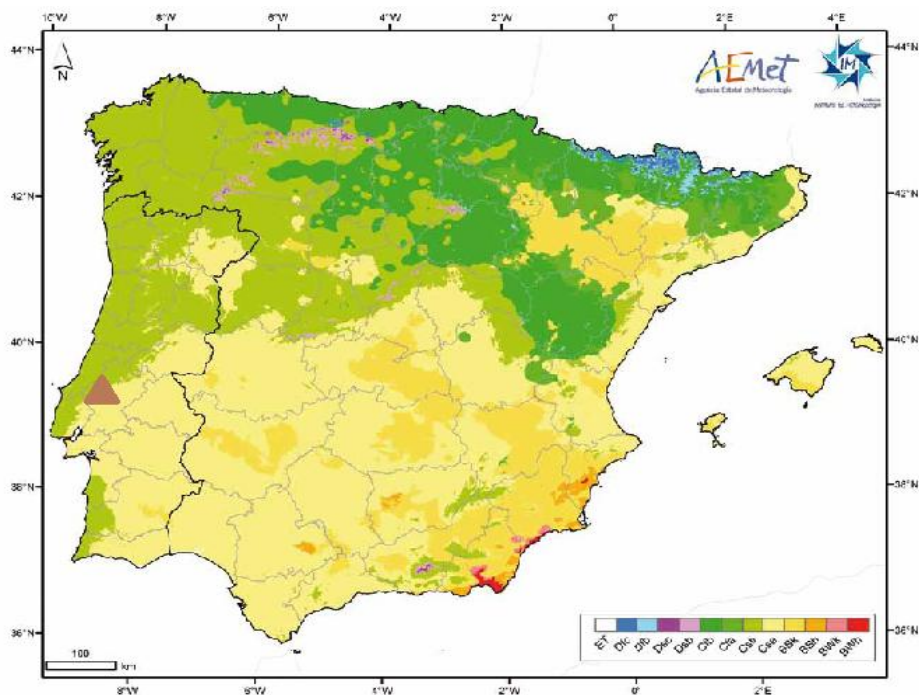
considerável, cerca de 700% mais que o controlo, contribuindo também para uma maior eficácia na absorção de nutrientes. A cultura de trigo foi utilizada para ensaios com o bioestimulante Goëmar, registando-se de acordo com os fabricantes aumentos de absorção de 11% para o N, 7 % para o S, e 10 % para o Mg e Mn após a aplicação do produto, no que toca a outro micronutriente, o Boro, nas culturas da beterraba, girassol e ervilha, observaram-se aumentos de absorção do nutriente em 10, 5 e 14%. A aplicação de um extrato de algas à base de *A. nodosum* resultou num incremento das concentrações de clorofila nas folhas tratadas em comparação com as folhas não tratadas (Blunden *et al.*, 1996), propondo os autores que este aumento de clorofila se deve às betainas presentes nos extratos de algas.

### 3. Material e métodos

#### 3.1. Características do local de ensaio

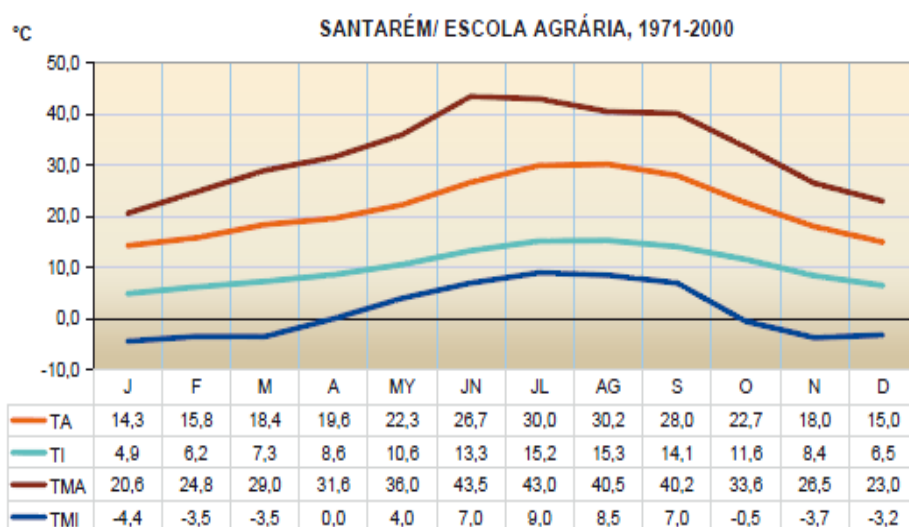
Os ensaios de campo conducentes a este trabalho foram realizados numa exploração denominada Quinta da Choufarra, propriedade da Casa Agrícola Soares Lopes. A quinta da Choufarra localiza-se no distrito de Santarém, a cerca de 2 Km da localidade Póvoa de Santarém tal como se pode verificar pelo triângulo castanho assinalado na Figura 5.

##### 3.1.1. Características climáticas

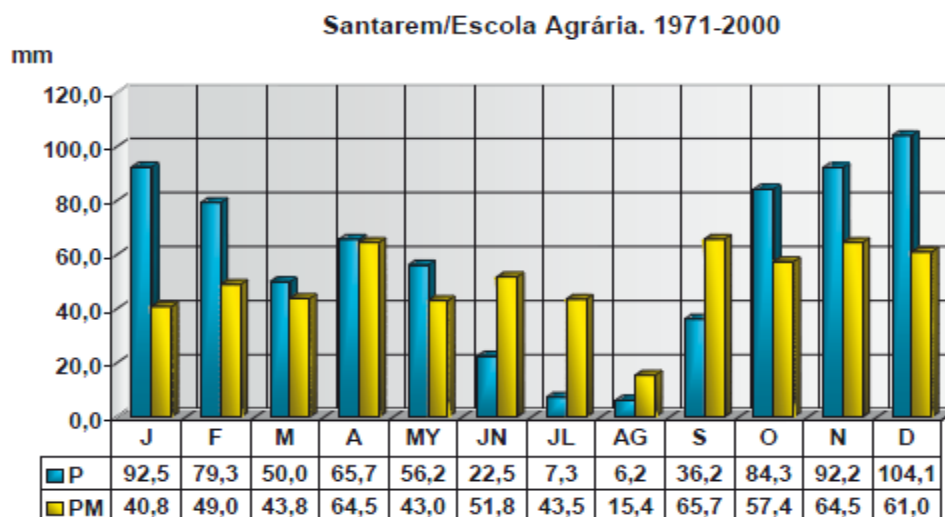


**Figura 5 Classificação climática de Köppen-Geiger na península ibérica (Atlas Climático Ibérico, 2011).**

A Quinta da Choufarra tem como principal actividade agrícola a produção de azeitona para a produção de azeite, actividade esta predominante na região onde se encontra localizada a exploração. As características edafoclimáticas da região revelam-se bastante apropriadas para a olivicultura. Utilizando a classificação de Thornthwaite, o clima da região é descrito por C1B"2sa", o que significa que é sub-húmido seco (índice hídrico compreendido entre -20 °C e 0%), mesotérmico (evapotranspiração potencial no ano 712 a 855 mm), com índices de humidade entre os 10 e os 20% e com eficácia térmica, no Verão, inferior a 48%. Com base nos resultados obtidos pela cartografia climática podemos verificar que, na localização da Quinta da Choufarra, a classificação climática de Köppen aplicada atribui o código Csa como exposto na Figura 5. Esta classificação Csa corresponde a um clima mesotérmico (temperado), com estação seca durante o Verão, temperatura média do ar no mês mais quente superior a 22 °C, enquanto a do mês mais frio está compreendida entre os 0 e 18 °C, a quantidade de precipitação no mês mais seco é inferior a um terço da do mês mais chuvoso do semestre frio e inferior a 40 mm (Atlas Climático Ibérico, 2011).



**Figura 6 Gráfico da: Temperatura média das máximas (TA), temperatura média das mínimas (TI), temperatura máxima absoluta mensal (TMA), temperatura mínima absoluta (Atlas Climático Ibérico, 2011).**



**Figura 7 Gráfico da precipitação máxima diária (PM) e precipitação média mensal (P) no período de 1971-2000 (Atlas Climático Ibérico, 2011).**

Com base na Figura 6 podemos verificar que a temperatura média do mês mais frio é de 4,9 °C no mês de Janeiro, cumprindo portanto a condição requerida pela classificação de Csa. Na Figura 6 observamos que a temperatura média do mês mais quente é de 22,6 °C, o que se verifica superior a 22 °C verificando-se portanto a completa classificação de Csa. Podemos observar na Figura 7 que o mês mais chuvoso é o mês de Dezembro com cerca de 104 mm e o mês mais seco o mês de Agosto com apenas 6,2 mm. Uma condição necessária para se verificar a classificação Csa está satisfeita pois um terço da precipitação do mês mais chuvoso é inferior a 40 mm e a precipitação do mês mais seco inferior ao mesmo terço.

### **3.1.2. Características de solos**

Dados fornecidos pela empresa agrícola mostram que os solos são argilo-calcários de textura fina, com pH compreendido entre 7,8 e 8,1, e com um teor de matéria orgânica de cerca de 1,9%. É efectuada neste olival todos os anos uma aplicação de ureia via fertirega no período de Março a Agosto, no ano em que se realizou o ensaio esta aplicação de ureia no olival verificou-se após a 1ª colheita de amostras ou seja depois de 18 de Maio continuando depois a sua aplicação que ronda os 70 Kg/ha.

Amostras de solo realizadas no olival da quinta da Choufarra alvo deste ensaio foram recolhidas e posteriormente analisadas no Laboratório Rebelo da Silva obtendo-se os seguintes valores:

Azoto total:0,13% Azoto nítrico:2,16 mg/kg e Azoto amoniacal:3,5 mg/kg

### 3.2. Material vegetal

Foram utilizadas na realização do ensaio oliveiras em plena produção com aproximadamente 36 anos de idade obtidas por propagação vegetativa na actual Unidade de Recursos Genéticos, Ecofisiologia e Melhoramento de Plantas, Ex-Estação Nacional de Melhoramento de Plantas (ENMP). O olival em causa representado na Figura 8 é composto por oliveiras de duas cultivares a 'Galega vulgar' e a 'Cobrançosa', é de regadio, utilizando um sistema de rega gota-a-gota. O compasso de plantação do olival é de 6 m por 7 m.




**Figura 8 Olival onde se realizou o ensaio na quinta da Choufarra.**

Realizou-se o tratamento com o produto à base de creme de algas recorrendo a um pulverizador acoplado a um tractor, deixando linhas sem tratamento propositadamente, para serem efectuadas amostras posteriormente utilizadas como controlo. O produto usado no tratamento foi um bioestimulante a base de creme de algas enriquecido por magnésio (37 g/l de MgO), boro (26 g/l), enxofre solúvel (73 g/l  $\text{SO}_3$ ) e azoto (41 g/l). Neste ensaio foi realizada uma aplicação única a 10-5-2012 de bioestimulante numa dose dupla da recomendada pelo fabricante, no estado 65 da escala (Sanz-Cortés *et al.*, 2002) presente em Anexo II, estado este que se caracteriza pela plena floração, com pelo menos 50% das flores abertas. Foram colhidas amostras de raízes, folhas e peças florais semanalmente ao longo dos diferentes estados fenológicos (abertura das primeiras flores, plena floração, queda das pétalas, frutinhos já com 2-3 mm de diâmetro, frutos com 5-7 mm de diâmetro), durante cerca de seis semanas. As datas das colheitas e os respectivos estados fenológicos das duas cultivares podem ser observados nos Quadros 5 e 6.



**Quadro 5 Datas de colheita das amostras e respectivos estados fenológicos da cultivar Galega.**

1ª Colheita 18-5-2012	estado 65 da escala BBCH de Sanz-Cortés <i>et al.</i> , 2002 Plena floração: pelo menos 50 % das flores estão abertas	
2ª Colheita 25-5-2012	estado 67 As pétalas brancas começam a cair	
3ª Colheita 1-6-2012	estado 69 Fim da floração, vingamento dos frutos e abscisão dos ovários não fecundados.	
4ª Colheita 8-6-2012	estado 71 Frutos com aproximadamente 10 % do seu tamanho final.	
5ª Colheita 15-6-2012	estado 75 Frutos com aproximadamente 50 % do seu tamanho final. Inicia-se o endurecimento do endocarpo (o fruto apresenta resistência ao corte).	

6ª Colheita 22-6-2012	estado 75 Frutos com aproximadamente 50 % do seu tamanho final. Inicia-se o endurecimento do endocarpo (o fruto apresenta resistência ao corte).	
--------------------------	---	--

**Quadro 6 Datas de colheita e respectivos estados fenológicos da cultivar Cobrançosa.**

1ª Colheita 18-5-2012	estado 65 da escala BBCH de Sanz-Cortés <i>et al.</i> , 2002 Plena floração: pelo menos 50 % das flores estão abertas	
2ª Colheita 25-5-2012	estado 69 Fim da floração, vingamento dos frutos e abscisão dos ovários não fecundados.	
3ª Colheita 1-6-2012	estado 71 Frutos com aproximadamente 10 % do seu tamanho final	
4ª Colheita 8-6-2012	estado 75 Frutos com aproximadamente 50 % do seu tamanho final. Inicia-se o endurecimento do endocarpo (o fruto apresenta resistência ao corte).	

Os estados fenológicos são uma importante ferramenta utilizada pelos agricultores e técnicos que desenvolvem a sua actividade na olivicultura e demais actividades agrícolas.

Os estados fenológicos nada mais são do que metas pré-estabelecidas que com o decorrer do ciclo cultural a cultura vai ultrapassando consecutivamente. Os factores climáticos tais como a temperatura, a precipitação entre outros desempenham um papel indispensável para o sucesso ou não da cultura. No caso da cultura do olival um período altamente sensível às condições meteorológicas é o período de floração e o período antecedente em que as temperaturas desempenham um papel preponderante, sendo a principal responsável pelo atraso quando muito baixas ou pelo adiantar da floração devido a temperaturas elevadas. A precipitação aquando do fenómeno do vingamento em conjunto com humidades relativas muito elevadas pode dificultar o sucesso da polinização interferindo bastante com as produções da cultura.

Foram colhidas amostras de 11 árvores, 8 da cultivar Galega e 3 da cultivar Cobrançosa. Nas 8 árvores da variedade Galega, a 4 das mesmas foi aplicado o bioestimulante, às restantes não foi aplicado. Nas 3 árvores da cultivar Cobrançosa foi aplicado o bioestimulante, utilizando-se os valores das 3 árvores sem aplicação do ensaio realizado pelo colega Diogo Graça (Graça, 2012). A escolha particular das árvores para o ensaio foi completamente aleatória, tendo como restrições apenas a boa apresentação dos exemplares e bom estado sanitário. Ao escolher as árvores optou-se por escolher árvores dispersas no seio da parcela, com o objectivo de minimizar efeitos de bordadura ou mesmo até diferenças microclimáticas no local do ensaio. As árvores foram identificadas com uma fita de cor vermelha e foi realizado um esquema da disposição das mesmas para facilitar as recolhas de material.

Foi aberta uma pequena cova na área projectada pela copa das árvores no solo para se recolher as raízes preferencialmente mais jovens, finas e menos suberificadas, visto apresentarem maior actividade na absorção de nutrientes. O material recolhido foi acondicionado em folhas de papel de alumínio devidamente identificadas e mantidas em gelo numa geleira para transporte, de modo a evitar oxidações até à sua pré-preparação em laboratório. No laboratório, as amostras de folhas e raízes foram lavadas e pesadas em fresco e depois secas com papel absorvente. Foram recolhidas 500 mg de raízes e 400 mg de folhas e de peças florais (inflorescências, flores ou frutinhos recém-vingados, conforme a data de colheita). As amostras foram depois sujeitas a um choque térmico por azoto líquido e conservadas a -70 °C, até à realização da extração de proteínas.

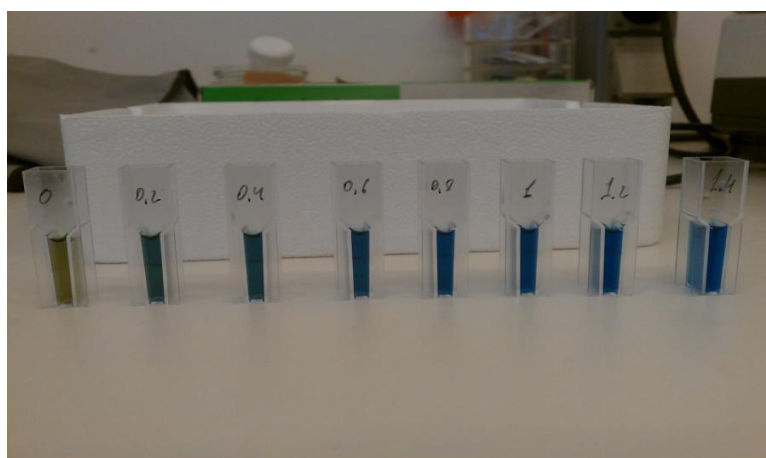
### **3.3. Preparação do extrato de material vegetal**

A quantificação das actividades das enzimas NR e GS pressupõe a preparação de um extrato de material vegetal. Para a realização do mesmo extrato procedeu-se à moenda em almofariz de porcelana (devidamente esterilizado) onde, em azoto líquido, se efectuou a moenda do material sem deixar descongelar o mesmo, de modo a evitar oxidações. Em

seguida ao processo de moenda, o material foi adicionado a um tubo tipo Eppendorf de 1,5 ml contendo 1 ml de solução tampão de extração segundo o método de Liu *et al.* (2008), composta esta por 50 mM de fosfato monopotássico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) pH 7,5, 2 mM ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), 1,5% (m/v) caseína solúvel, 2 mM ditioneitol (DTT), e 1% (m/v) polivinilpirrolidona. Adicionou-se 10  $\mu\text{l}$  de  $\beta$ -mercaptoetanol às amostras de raiz ou 7,5  $\mu\text{l}$   $\beta$ -mercaptoetanol a amostras de folha ou órgãos florais. O  $\beta$ -Mercaptoetanol foi aplicado para evitar a oxidação do material. Os tubos contendo o material foram sujeitos a duas centrifugações ambas com temperatura de 4 °C, sendo a primeira de 5 minutos a 3000 rpm; seguidamente, foi retirado o sobrenadante para novo tubo Eppendorf e centrifugou-se pela segunda vez a 15 minutos a 13000 rpm. Para finalizar o procedimento retirou-se novamente o sobrenadante e colocou-se o mesmo num novo tubo Eppendorf de 1,5 ml devidamente identificado, conservou-se a -20 °C até à realização da determinação da proteína total e dos ensaios enzimáticos da actividade da NR e GS.

### 3.3.1. Quantificação proteica

Após a preparação dos extratos de material vegetal procedeu-se à quantificação proteica dos mesmos, recorrendo à metodologia de Bradford (Bradford, 1976) que se baseia no processo de detecção colorimétrica. Utilizou-se o reagente de Bradford da firma BIORAD diluído na proporção de 1:5 com água destilada, a solução foi filtrada mediante a utilização de um filtro de 90 mm da marca Advantec. Foi adicionado a 20  $\mu\text{l}$  de extrato de raiz, folha ou órgãos 1 ml da solução efectuada de Bradford numa cuvette para medição no espectrofotómetro GeneQuant $pro$  a 595 nm. A curva padrão foi preparada com 20  $\mu\text{l}$  de solução padrão BSA (albumina sérica de bovino) com diferentes concentrações, sendo estas de 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1; 1,2; 1,4 mg/ml. As absorvâncias foram medidas no espectrofotómetro a 595 nm, a curva padrão realizada proporcionou a conversão das mesmas a mg de proteína por ml, ou seja, a sua concentração de proteína solúvel.

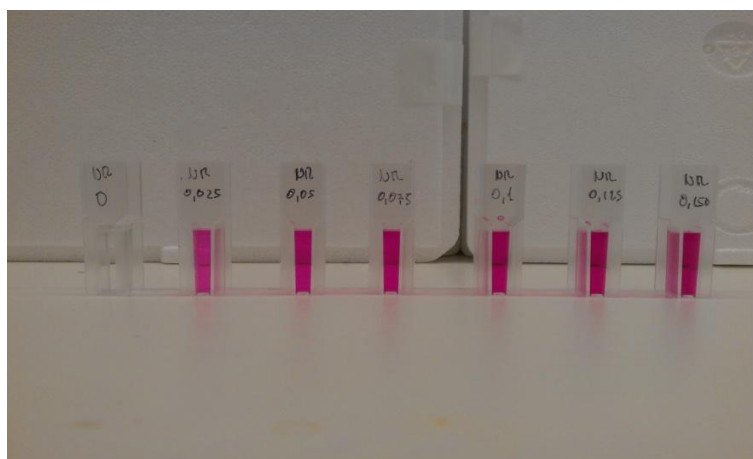


**Figura 9** Curva padrão BSA.



### 3.3.1.1. Quantificação da NR

Para a determinação da NR utilizou-se um método de colorimetria, seguindo-se o protocolo descrito por Kaiser e Lewis (1984). Em cada tubo de Eppendorf de 1,5 ml colocou-se 25 µl de tampão de fosfato de potássio a 50 mM com pH 7,5, 25 µl de Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídeo NADH (1 mg/ml), 50 µl de nitrato de potássio ( $\text{KNO}_3$ ) a 0,1 M, e 350 µl de água destilada. A esta solução foi adicionado 25 µl de extrato de folhas ou 50 µl de extratos de raiz. No caso do extrato de raiz foi utilizado 50 µl devido a dificuldades na detecção da actividade enzimática em ensaios prévios, ensaios estes em que se estabeleceram os volumes a utilizar nos extratos. Assim nas folhas e peças florais, adicionou-se 25 µl de água destilada extra de modo a perfazer o volume e uniformizar o mesmo em toda a experimentação. Segundo o protocolo original, o tempo de incubação em banho-maria a 28 °C seria de 15 minutos, no presente trabalho utilizaram-se 18 horas a 28 °C. Findo o período de incubação a reacção foi terminada com recurso a uma solução 1:1 de 250 µl de Dihidrocloreto-naftiletilenodiemina NED a 0,02% (m/v) e 250 µl de Sulfanilamida a 1% (m/v) dissolvida em 1,5 M de ácido clorídrico. Após a reacção terminada transferiu-se a solução para cuvettes para medição no espectrofotómetro Shimadzu UV-2100, medindo a 540 nm o nitrito formado durante a reacção enzimática. Complementarmente, efectuou-se uma curva padrão, utilizando uma gama de soluções de nitrito de sódio  $\text{NaNO}_2$  com concentrações conhecidas 0; 0,025; 0,05; 0,075; 0,1; 0,125; 0,150 mM.

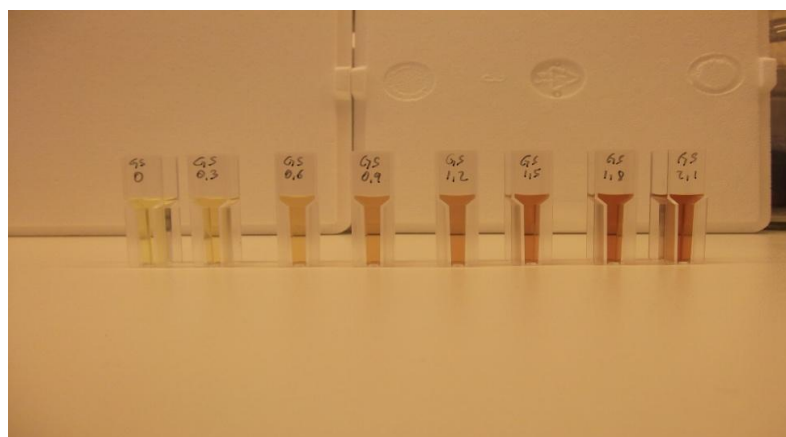


**Figura 10 Curva padrão da NR.**

### 3.3.1.2. Quantificação GS

A determinação da actividade da enzima GS seguiu também metodologias de detecção colorimétrica desenvolvidas por Kaiser e Lewis (Kaiser e Lewis, 1984). Utilizou-se 900 µl de um substrato aos quais se adicionou 100 µl de extrato de raiz, folhas ou órgãos florais. O substrato é formado por 184 µmol de ácido glutâmico, 90 µmol de sulfato de magnésio ( $\text{MgSO}_4$ ), 12 µmol de hidroxilamina, 100 µmol de imidazol e 36 µmol ATP. O período de incubação durou 15 minutos com temperatura de 28 °C. A paragem da reacção

verificou-se ao ser adicionado 500 µl de solução de cloreto de ferro, solução preparada com 4 g de ácido tricloroacético, 3,2 g de cloreto de ferro anídrico e 100 ml de 0,5 M HCl. Após terminada a reacção, os tubos Eppendorf foram sujeitos a uma centrifugação a 8000 rpm durante 5 minutos, de seguida o volume da reacional foi transferido para cuvettes de modo a serem medidas as absorvâncias a 500 nm no espectrofotómetro Shimadzu UV-2100. Calculou-se portanto a concentração de glutamil-hidroxamato procedente da actividade do glutamato sintetase presente no extrato. Efectuou-se também uma curva padrão para conversão das concentrações, utilizando as seguintes concentrações 0; 0,3; 0,6; 0,9; 1,2; 1,5; 1,8; 2,1 mM de glutamil-hidroxamato na curva de calibração.



**Figura 11 Curva padrão da GS.**

As actividades enzimáticas foram expressas em termos de produto final (nitrito e glutamil hidroxamto) produzido, relacionando a concentração da solução de reacção com a concentração da proteína total solúvel, obtendo-se µmol nitrito/ mg de proteína total solúvel e µmol glutamil hidroxamato/ mg de proteína total solúvel.

### **3.3.2. Tratamento estatístico**

Utilizou-se como ferramenta estatística a análise de variância (ANOVA), e o tratamento dos dados realizou-se através do programa informático Statistix 9. O nível de significância foi de  $\alpha = 0,05$ . Foram realizadas duas ANOVAS para as comparações entre modalidades, a primeira avaliou o efeito ou não da aplicação do bioestimulante em cada data e órgão. A segunda comparou a evolução ao longo das 6 datas de colheitas nos diversos órgãos e com a presença ou não do tratamento com bioestimulante. Em situações em que se verificaram diferenças significativas nas análises de variância ( $p\text{-value} \leq 0,05$ ), realizou-se o teste de Tukey para comparação de médias.

## **3.4. Avaliação de produção**

No mês de Novembro procedeu-se à colheita da azeitona em quatro linhas de oliveiras, duas das quais tratadas com o bioestimulante e duas não tratadas.

### 3.5. Resultados

A análise da variável clima é de notável importância na interpretação e discussão dos resultados obtidos neste trabalho. É de salientar que a análise meteorológica permite uma melhor compreensão e explicação de alguns fenómenos ocorridos no decurso temporal da cultura, tais como avanços ou atrasos na evolução dos estados fenológicos, intervenção positiva ou negativa nos fenómenos de vingamento, indução floral entre outros.

### 3.6. Análise climática

Os dados climáticos analisados são provenientes da estação meteorológica contígua ao olival onde se realizou o ensaio localizada na Herdade de Vale dos Lobos. Serão analisados os dados referentes ao ciclo anual da oliveira de 07-2011 a 07-2012 período que compreende a indução floral ao início da maturação do fruto/endurecimento do caroço. Nesta série de dados podemos verificar na Figura 12 que a temperatura média máxima se verifica no mês de Setembro com valor de 29,5 °C, apesar de Agosto apresentar um valor muito próximo de 29,4 °C. A temperatura média mínima ocorre no mês de Fevereiro com o valor de 2,1 °C tal como se pode verificar na Figura 13. No referente à temperatura média das máximas pode-se considerar um valor dentro dos parâmetros, normal, não apresentando qualquer perigo à oliveira, que apenas acima dos 40 °C sofre danos consideráveis. As temperaturas médias mínimas, ao se observarem no mês de Fevereiro, não são tão prejudiciais quanto se se verificassem na Primavera, onde poderiam influenciar negativamente o vingamento.

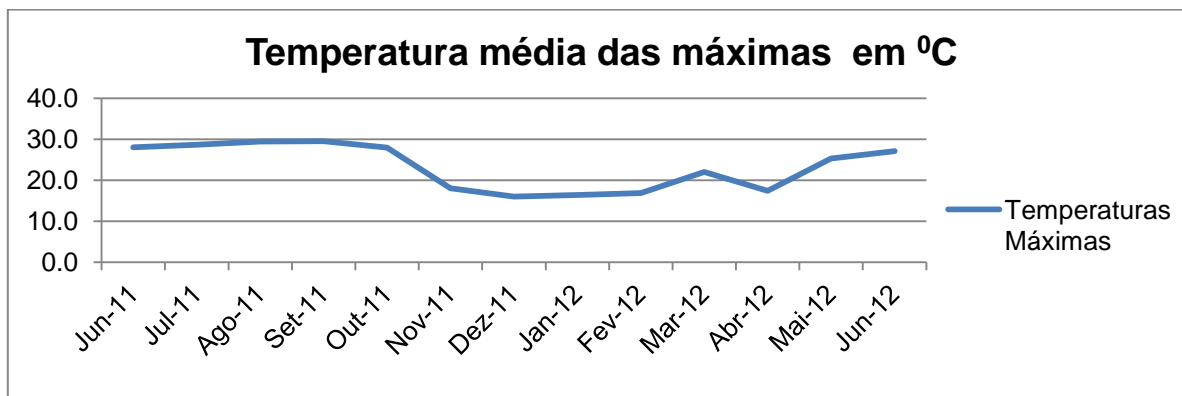
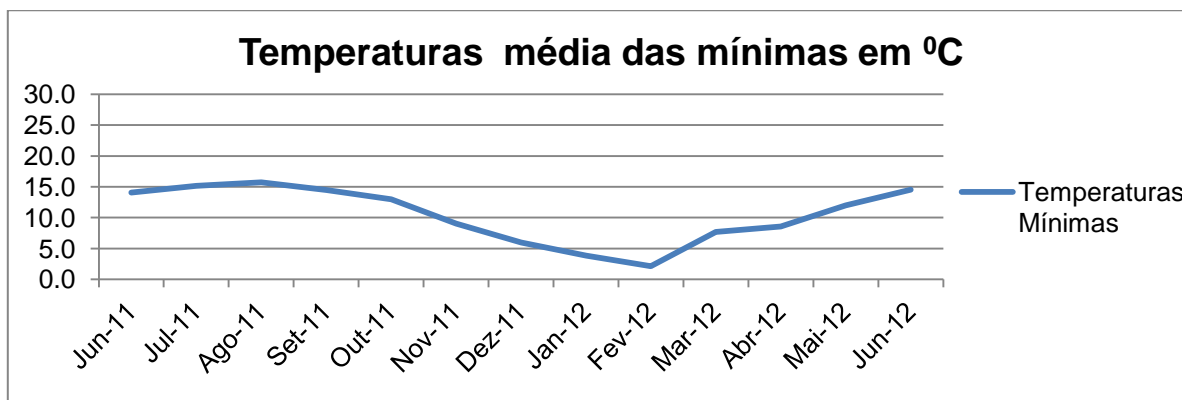


Figura 12 Gráfico das temperaturas médias das máximas no período de realização do ensaio.

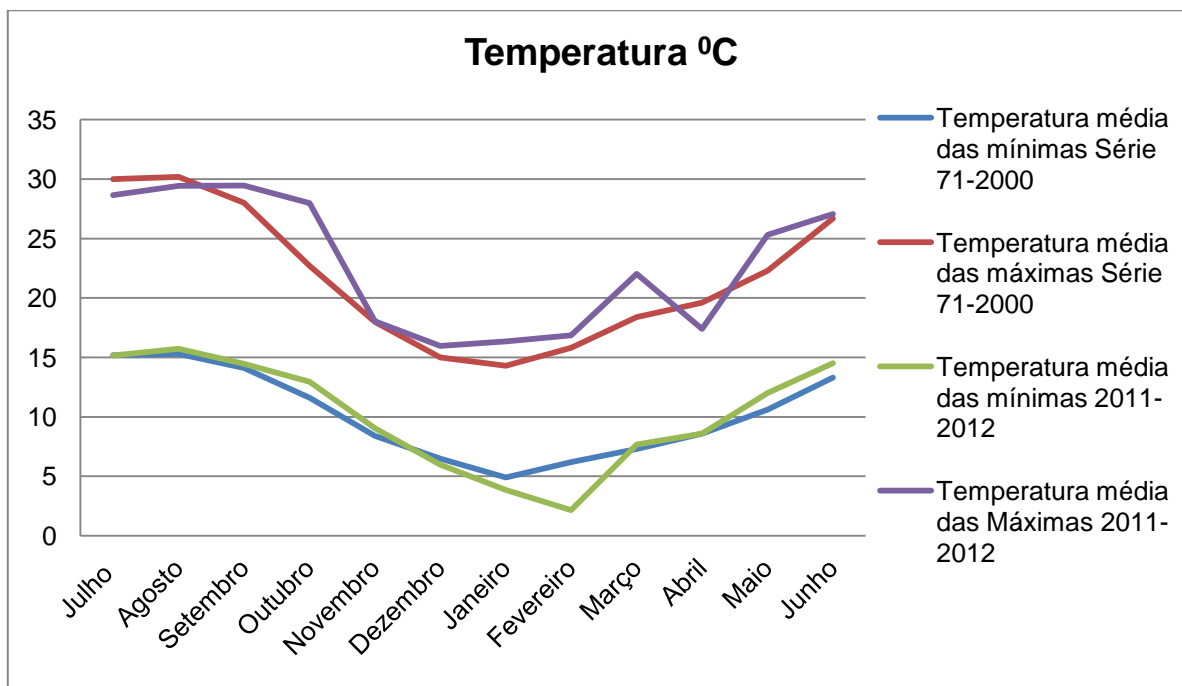


**Figura 13 Gráfico das temperaturas médias das mínimas no período de realização do ensaio.**

Para melhor comparar as temperaturas que se fizeram sentir nesta série de meses em que se realizou o ensaio com as temperaturas que habitualmente se fazem sentir na região, utilizaram-se dados climáticos de uma série de anos de 1971 a 2000 (Atlas Climático Ibérico, 2011) para termo de comparação. Esta série de dados de cerca de 30 anos permite-nos concluir se ocorreram “discrepâncias” climáticas entre as temperaturas do período do ensaio com as temperaturas que caracterizam a região.

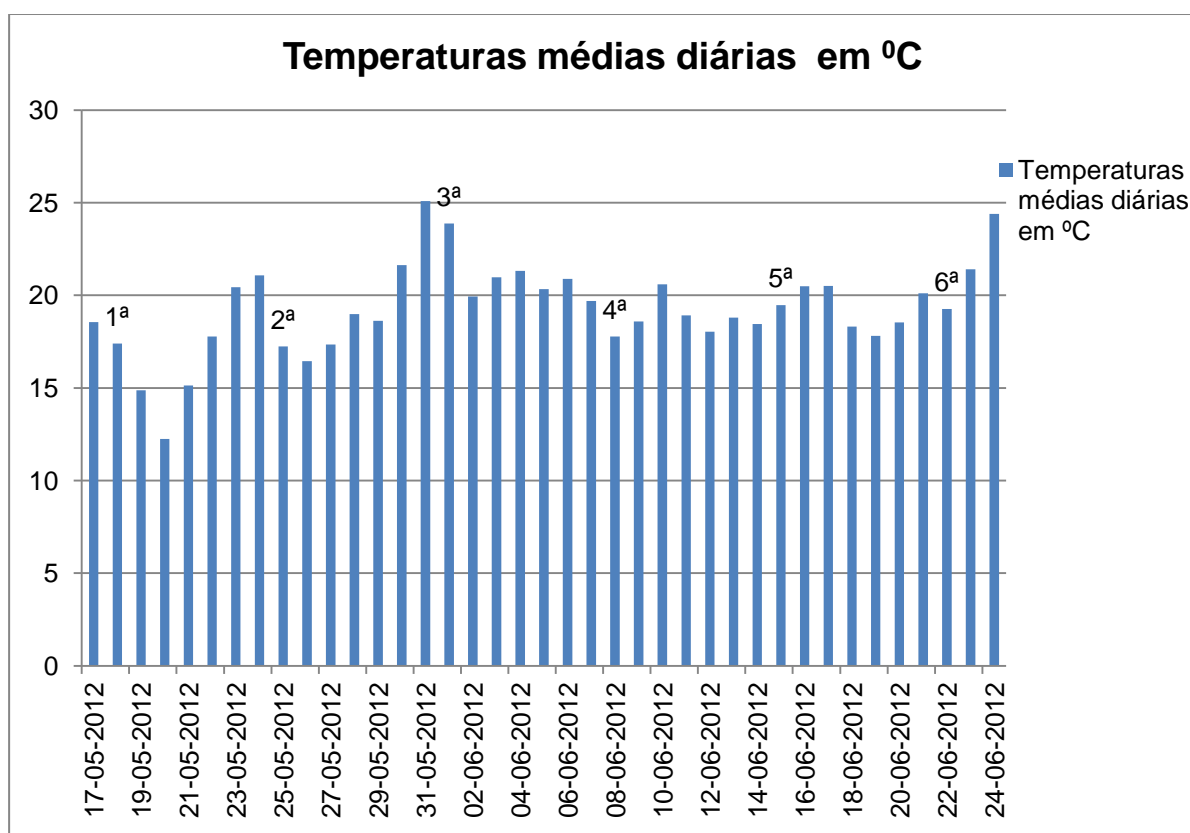
A temperatura máxima verificada no período do ensaio tal como se verifica na Figura 14 mantém-se a par da temperatura máxima da série 1971-2000 durante os meses Julho, Agosto e Setembro, apresentando em Outubro uma queda mais marcada que a verificada na série de 1971-2000, prosseguindo depois durante Novembro, Janeiro, Fevereiro numa visível concordância entre a série de 30 anos e as temperaturas máximas verificadas. Registou-se em Março um desvio para temperaturas máximas mais elevadas que as registadas na série de 1971-2000, seguindo sucessivamente novamente a par do termo de comparação. No respeitante às temperaturas mínimas a série de 1971-2000 na Figura 14 podemos também verificar a semelhança às temperaturas mínimas verificadas, apenas no mês de Fevereiro a mínima oscila para temperaturas mais baixas que as da série de 71-2000. Em relação ao termo de comparação não se verificam diferenças assinaláveis.





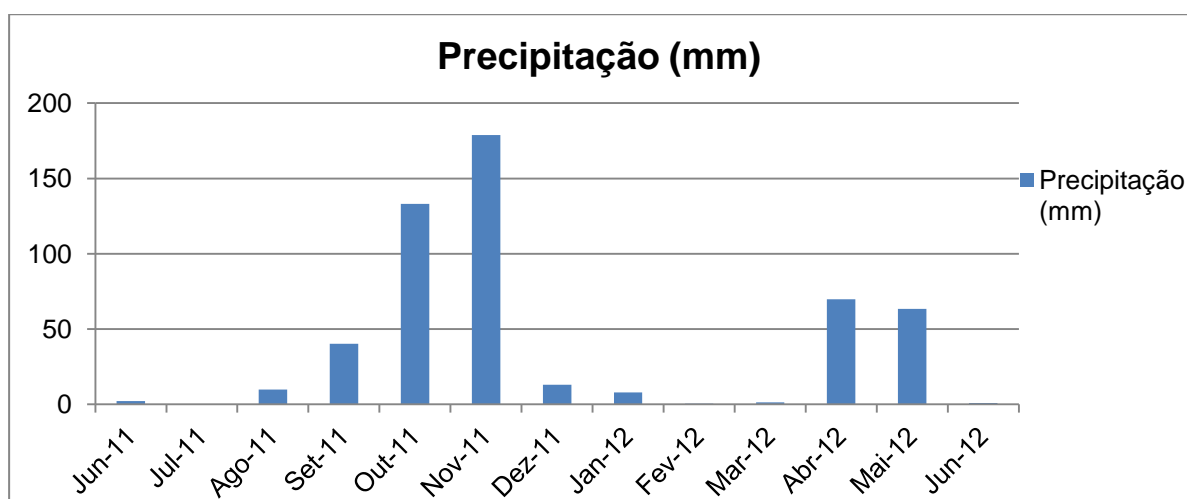
**Figura 14 Gráfico de comparação de temperaturas médias máximas e mínimas entre a série 71-2000 e 06/2011 a 07/2012.**

As temperaturas médias diárias que se fizeram sentir nas datas de colheita rondaram os 18 °C a 25 °C (Figura 15).



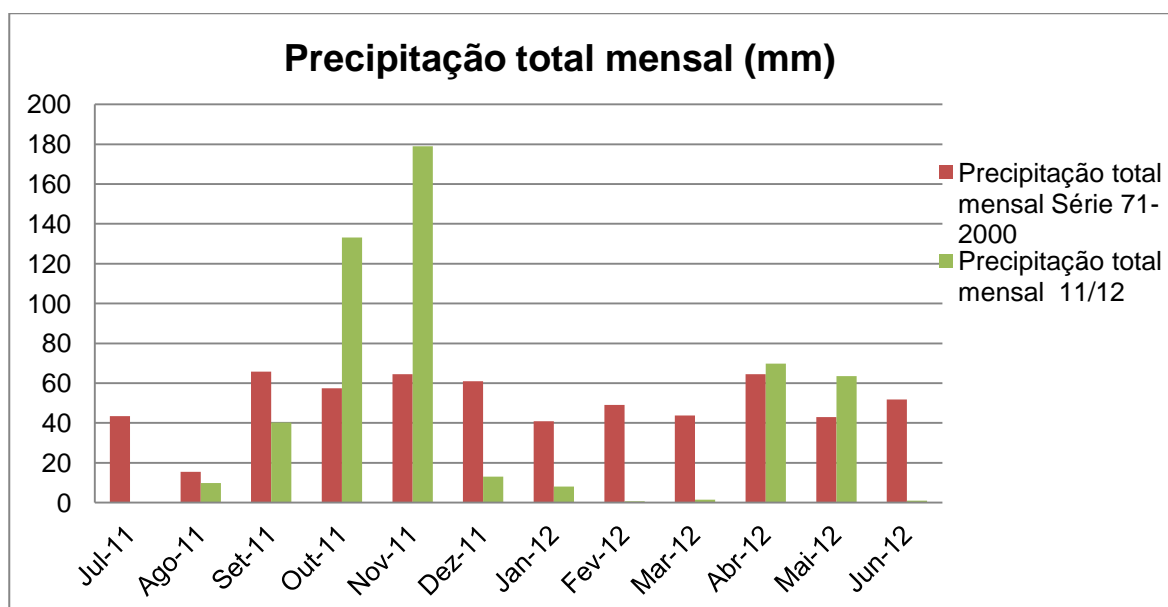
**Figura 15 Temperaturas médias diárias.**

A par da variável climática temperatura também a precipitação registada ao longo do ensaio, estando representada graficamente na Figura 16 é importante para estimar como interferiu o clima no ano agrícola. Durante o período do ensaio os meses de Outubro e Novembro de 2011 foram bastante chuvosos com precipitações a atingir valores de 133 mm e de 178 mm, respectivamente. Visto o olival utilizado no ensaio estar dotado de rega gota-a-gota a ausência ou baixíssima precipitação em 5 dos meses dos ensaios, especialmente em Fevereiro e Março de 2012 não cria problemas no olival.



**Figura 16 Precipitação no período de 06-2011 a 07-2012.**

Para melhor nos situarmos em relação aos valores da precipitação recorreremos aos valores da série de precipitações totais mensais dos anos correspondentes a 1971-2000. Analisando o gráfico da Figura 17 verificamos em primeiro lugar a excecional precipitação nos meses de Outubro e Novembro, que ultrapassa claramente os valores da série de 1971-2000. Pelo contrário, os meses de Julho de 2011, Fevereiro, Março e Junho de 2012 não apresentam qualquer precipitação o que na série de 1971-2000 não acontece, originando uma disparidade de valores.



**Figura 17 Comparação de precipitações entre a série 71-2000 e 06/2011 a 07/2012.**

### **3.7. Resultados**

Apresentam-se de seguida os resultados obtidos para as actividades enzimáticas nos diferentes órgãos, datas e modalidade, nas duas cultivares, Galega e Cobrançosa; este estudo debruçou-se essencialmente sobre a primeira variedade; em complemento, colheram-se também dados da variedade Cobrançosa, que foram comparados com dados de amostras não tratadas com bioestimulante obtidos no âmbito de um trabalho da disciplina de projecto de final da Licenciatura em Biologia do colega Diogo Graça (Graça, 2012).

Nas raízes, os valores das actividades enzimáticas oscilaram nas duas cultivares entre a inexistência de actividade e valores de 80  $\mu\text{mol}$  glutamil hidroxamato/ mg de proteína total solúvel para a GS, no caso da NR os valores enquadram-se entre a inexistência de actividade e 20  $\mu\text{mol}$  nitrito/ mg de proteína total solúvel. Já nas folhas os valores das actividades enzimáticas nas duas cultivares variaram entre 20  $\mu\text{mol}$  glutamil hidroxamato / mg de proteína total solúvel e 90  $\mu\text{mol}$  glutamil hidroxamato / mg de proteína total solúvel para a GS, para a NR os valores oscilaram entre a inexistência e 30  $\mu\text{mol}$  nitrito/ mg de proteína total solúvel. Nos órgãos florais, os valores das actividades nas duas variedades variaram entre 10  $\mu\text{mol}$  glutamil hidroxamato / mg de proteína total solúvel e 180  $\mu\text{mol}$  glutamil hidroxamato / mg de proteína total solúvel para a GS, para a NR os valores oscilaram entre a inexistência da actividade e 25  $\mu\text{mol}$  nitrito/ mg de proteína total solúvel.

De modo a analisar os resultados obtidos no trabalho experimental anteriormente descrito foi realizado um tratamento estatístico, utilizando como ferramenta estatística a análise de variância, vulgarmente chamada ANOVA. Os dados foram sujeitos a duas comparações distintas e ao mesmo tempo indissociáveis, a primeira consistiu em realizar uma comparação entre amostras alvo de aplicação do bioestimulante em estudo e amostras

sem a aplicação do mesmo ao longo das datas de colheita e uma segunda comparação em que se avalia a evolução dos valores das actividades enzimáticas nas amostras tratadas, e nas não tratadas, ao longo das diferentes datas de colheita. Em ambos os casos efectuou-se uma ANOVA a 1 factor diferindo apenas nos níveis; no caso da variedade Galega, na primeira comparação verificaram-se 2 níveis e na segunda comparação verificaram-se 6 níveis, já no caso da variedade Cibrão utilizaram-se 2 níveis na primeira comparação e 4 níveis na segunda, visto serem menos datas de colheita. Os resultados das ANOVAs encontram-se no Anexo I, apresentando-se neste capítulo apenas os quadros resumo dessas mesmas análises.

### **3.7.1. Cultivar Galega**

Na cultivar Galega, as amostras de raiz (Figura 18) são as que maiores oscilações demonstram, não revelando uma orientação de valores de actividade enzimática específica, nem em função da aplicação do bioestimulante nem em função da data.

Contudo, a actividade da NR tende a aumentar nas datas finais de colheita (Figura 18), visto a 1ª e a 3ª data de colheita apresentarem valores de actividade da NR baixíssimos. A 2ª, 4ª, 5ª e 6ª colheita apresentam já valores mais elevados.

Nas folhas da cultivar Galega, as actividades das enzimas NR e GS apresentam-se um pouco mais estáveis do que nos restantes órgãos analisados (Figura 19). No caso da actividade da GS observam-se valores estáveis ao longo do tempo, notando-se apenas na 1ª e 3ª colheita valores médios de actividade mais elevados nas folhas não tratadas com o bioestimulante, sendo nas restantes colheitas as folhas alvo de tratamento a apresentar valores mais elevado, acentuando-se essa diferença na 6ª colheita. No referente à NR, a 1ª colheita apresenta valores médios de actividade baixos, apresentando estes um aumento na 2ª colheita, decrescendo durante a 3ª e 4ª, retomando a tendência de aumento nas duas últimas colheitas. No caso dos órgãos florais da cultivar Galega, os valores referentes à actividade da enzima GS apresentam uma assinalada tendência de subida ao longo das 6 datas de colheita (Figura 20). No respeitante à enzima NR, verificamos a existência de actividade nas três primeiras colheitas, apresentando um pico na 2ª colheita, entrando em declínio na 3ª colheita, nas restantes é mesmo quase inexistente.

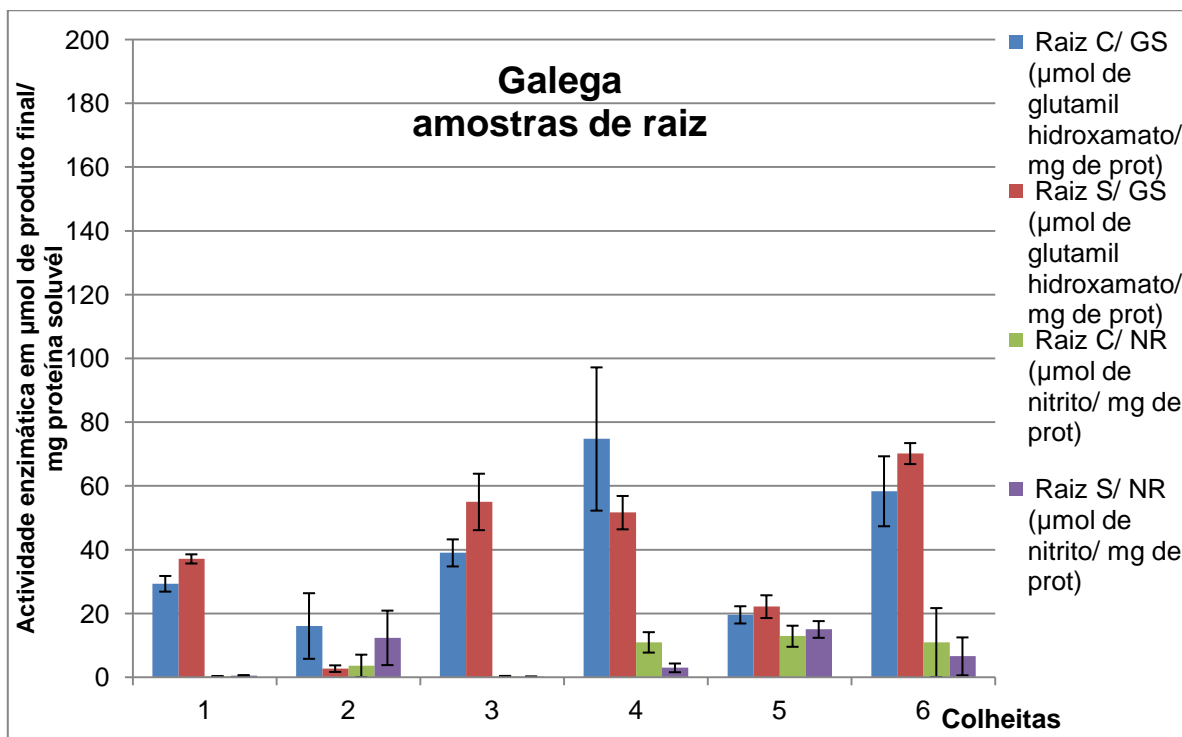


Figura 18 Actividade média das enzimas NR ( $\mu\text{mol}$  de nitrato por mg proteína total solúvel) e GS ( $\mu\text{mol}$  de glutamil hidroxamato por mg proteína total solúvel) ao longo do período estudado para a cultivar Galega nas amostras de raiz. O comprimento das linhas de erro é 2x o erro padrão (n=4). Legenda: Raiz C/ - raiz de árvores com bioestimulante aplicado; Raiz S/ - raiz de árvores sem bioestimulante aplicado.

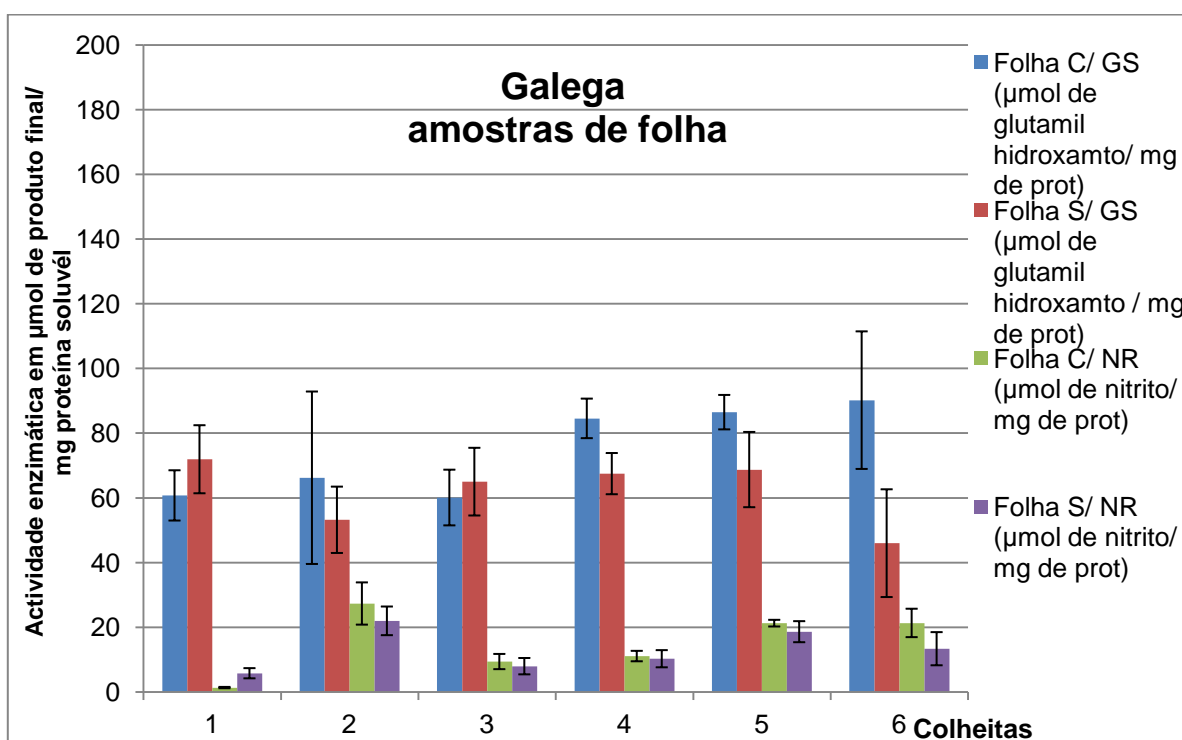
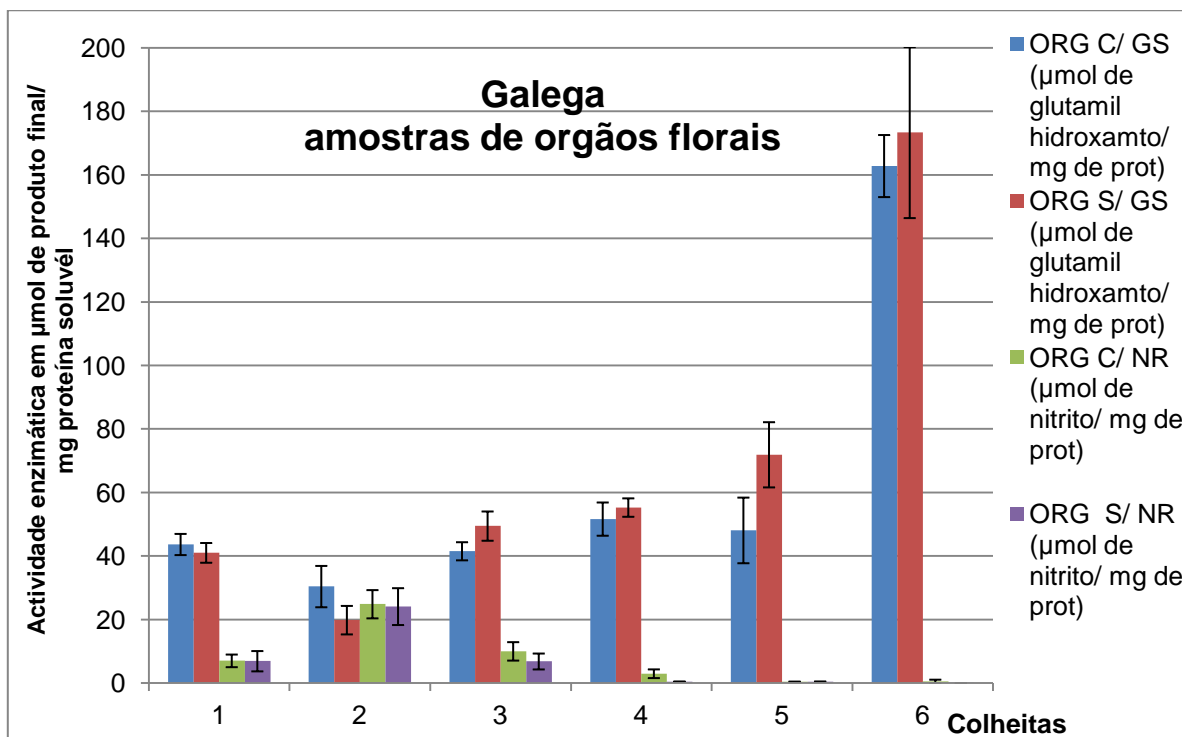


Figura 19 Actividade média das enzimas NR ( $\mu\text{mol}$  de nitrato por mg proteína total solúvel) e GS ( $\mu\text{mol}$  de glutamil hidroxamato por mg proteína total solúvel) ao longo do período estudado para a cultivar Galega nas amostras de folhas. O comprimento das linhas de erro é 2x o erro padrão (n=4). Legenda: Folhas C/ - folhas de árvores com bioestimulante aplicado; Folhas S/ - folhas de árvores sem bioestimulante aplicado.



**Figura 20** Actividade média das enzimas NR ( $\mu\text{mol}$  de nitrito por  $\text{mg}$  proteína total solúvel) e GS ( $\mu\text{mol}$  de glutamyl hidroxamato por  $\text{mg}$  proteína total solúvel) ao longo do período estudado para a cultivar Galega nas amostras de órgãos florais. O comprimento das linhas de erro é 2x o erro padrão ( $n=4$ ). Legenda: ORG C/ - órgãos florais de árvores com bioestimulante aplicado; ORG S/ - órgãos florais de árvores sem bioestimulante aplicado.

Em relação à análise do efeito da aplicação ou não do produto bioestimulante nas actividades enzimáticas em cada uma das várias datas de colheita, no caso das amostras de raiz verifica-se em todas as comparações *p-value* superiores ao nível de significância de  $\alpha = 0,05$ , excepto na primeira colheita no caso da actividade da GS em que o *p-value* é de 0,0337 (Quadro 7), verificando-se por isso que, neste caso, com base no teste de Tukey o bioestimulante afecta significativa e negativamente a actividade enzimática, observando-se as amostras sem aplicação de bioestimulante com valores superiores às amostras com aplicação de bioestimulante.

Nas amostras de folha verificamos apenas existir influência da aplicação do produto ao nível da actividade da NR da primeira colheita, já que o valor do *p-value* é de 0,0314, menor que o nível de significância de  $\alpha = 0,05$  utilizado (Quadro 7). O teste de Tukey efectuado demonstra que o efeito sobre as actividades das folhas é negativo uma vez que as amostras sem aplicação de bioestimulante apresentam valores superiores (Anexo I)

Já para todas as amostras de órgãos florais os valores de *p-value* observados superam  $\alpha = 0,05$  (Quadro 7), ou seja, a aplicação do bioestimulante não afecta as actividades enzimáticas nem da GS nem da NR.

**Quadro 7** Resumo dos resultados da análise estatística de comparação entre aplicação ou não de bioestimulante na cultivar Galega nas 6 datas amostradas. ( $\alpha = 0,05$ ) (\*a cinzento escuro salientam-se os *p-value* superiores ao nível de significância).

Colheita	<i>p-value</i>	GS	NR		GS	NR		GS	NR
<b>1ª 18-5-2012</b>	raiz	0,0337	0,3684	folha	0,4255	0,0314	órgãos florais	0,5838	0,9779
<b>2ª 25-5-2012</b>	raiz	0,6194	0,355	folha	0,5068	0,4096	órgãos florais	0,2296	0,9224
<b>3ª 1-6-2012</b>	raiz	0,1546	0,9089	folha	0,7296	0,6922	órgãos florais	0,2116	0,4718
<b>4ª 8-6-2012</b>	raiz	0,1755	0,2297	folha	0,1013	0,7999	órgãos florais	0,5656	0,1164
<b>5ª 15-6-2012</b>	raiz	0,5864	0,6325	folha	0,2146	0,4692	órgãos florais	0,1531	0,6403
<b>6ª 22-6-2012</b>	raiz	0,3419	0,7373	folha	0,1528	0,2825	órgãos florais	0,7258	0,5158

Na comparação das actividades em cada órgão (Quadro 8) ao longo das diferentes datas de colheita existem factos a assinalar.

Nas amostras de raiz das plantas com a aplicação de bioestimulante, observa-se para as amostras de GS um valor de *p-value* de 0,0115, demonstrando que o factor data influencia a actividade da GS. Deste modo realizou-se um teste de comparação múltipla de médias, o teste de Tukey, verificando-se que a 4ª data apresenta valores significativamente superiores aos da 5ª e 2ª, sendo os valores da 1ª, 3ª e 6ª valores intermédios (Anexo I).

Nas amostras de raiz sem a aplicação do bioestimulante voltamos a encontrar novamente nas amostras de GS um *p-value* menor que 0,05 neste caso de 0,000, traduzindo a influência da data na actividade enzimática. Realizando o teste de Tukey, verificamos que a 6ª data é a que apresenta valores mais altos, a 2ª valores mais baixos tendo as outras datas valores intermédios (Anexo I). A data de colheita não influencia a actividade da NR nas amostras de raiz.

Nas amostras de folhas da variedade Galega, nas folhas com aplicação de bioestimulante a data não afecta a actividade da GS, sendo o *p-value* de 0,537, mas afecta a actividade da NR, sendo o *p-value* de 0,0005. Do teste de comparação múltipla de médias para as amostras de NR, resulta que a 2ª data apresenta valores significativamente superiores à 1ª data tendo as outras quatro valores intermédios (Anexo I). Nas amostras de folha sem aplicação de bioestimulante a data não influenciam a actividade da GS, face ao um *p-value* de 0,4408, mas verifica-se efeito na actividade da NR, demonstrado pelo *p-value* de 0,0283. O teste de Tukey realizado para as amostras de NR resulta num comportamento semelhante ao das amostras com aplicação de bioestimulante (2ª data significativamente maior que a 1ª, as outras com valores intermédios (Anexo I)).

Nas amostras de órgãos com a aplicação de bioestimulante, verificou-se a influência do factor data tanto nas actividades da GS como da NR, traduzindo-se pelos *p-value* de 0,000. Efectuou-se mais uma vez o teste de Tukey e no caso das médias de GS verificou-se que a 6ª data apresenta valores significativamente mais altos que todas as outras médias. Quanto às médias das actividades de NR, a 2ª colheita apresenta a maior média, constituindo as restantes um segundo grupo dentro do qual as médias não são significativamente diferentes entre si (Anexo I).

Para as amostras de órgãos que não foram alvo da aplicação de bioestimulante verifica-se tanto para as amostras de NR como de GS *p-value* de 0,000 e de 0,001, que nos demonstra mais uma vez a influência do factor data. Nos testes de Tukey realizados verificou-se para o caso da GS a existência de dois grupos nos quais as médias são significativamente diferentes, a 6ª colheita apresenta a maior média, formando as restantes colheitas um segundo grupo. No caso da actividade da NR, a 2ª colheita apresenta a maior média e as restantes colheitas formam novamente um segundo grupo.

**Quadro 8** Quadro resumo da análise estatística das actividades enzimáticas GS e NR nas diferentes datas de colheita nas amostras tratadas e não tratadas com bioestimulante (C/S) da cultivar Galega (\*a cinzento escuro salientam-se os *p-value* superiores ao nível de significância).

<i>p-value</i>	GS	NR
raiz C/	0,0115	0,2898
raiz S/	0,00	0,3388
folha C/	0,5374	0,0005
folha S/	0,4408	0,0283
órgão C/	0,00	0,00
órgão S/	0,00	0,0001

### 3.7.2. Cultivar Cobrançosa

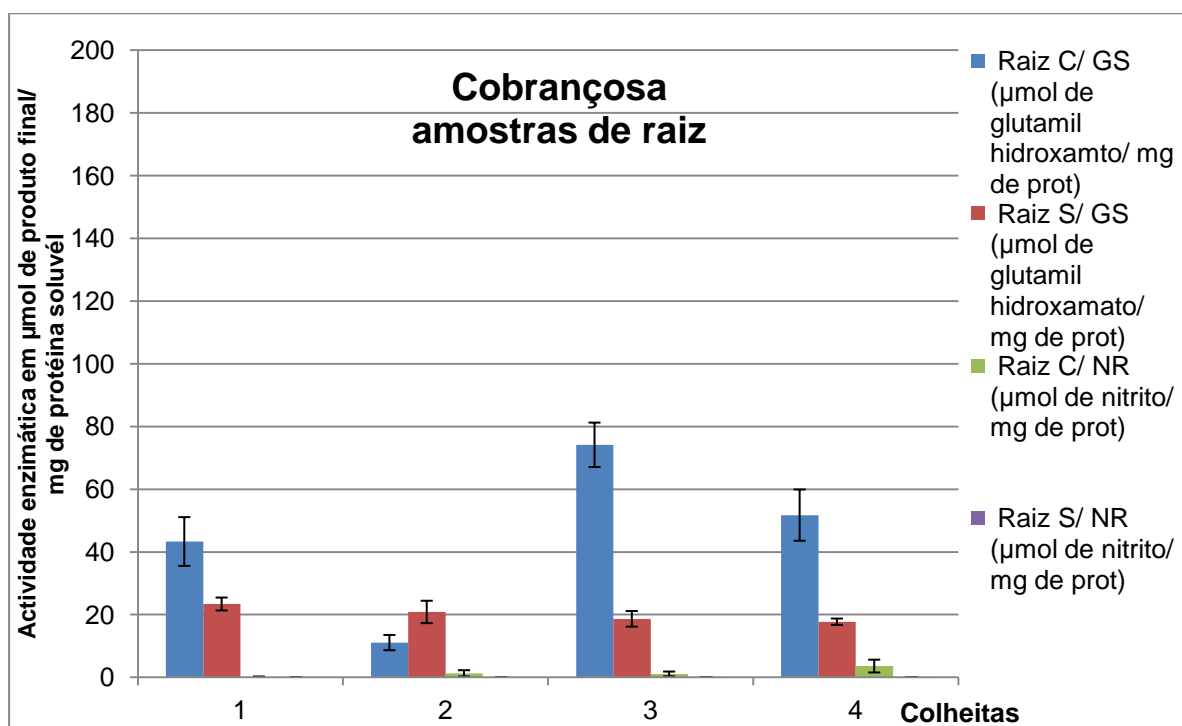
Nas amostras de raiz, a actividade enzimática referente à GS é tendencialmente superior nas amostras tratadas com bioestimulante (à exceção da 2ª data) (Figura 21). No que toca à actividade da enzima NR, as amostras de raiz demonstram valores bastante baixos ou inexistentes, apenas na última colheita se verifica fraca actividade apenas nas amostras tratadas com o produto; nas amostras sem bioestimulante os valores são vestigiais.

Na cultivar Cobrançosa, nas quatro colheitas, as folhas tratadas com bioestimulante apresentam tendencialmente actividade de GS superior às folhas não tratadas (Figura 22). Além disso, nota-se claramente uma tendência de aumento de actividade ao longo das quatro colheitas, apenas na 2ª colheita se verificou uma diminuição suave da actividade



enzimática e também se suavizou a diferença verificada entre as amostras com e sem aplicação, à semelhança do que se verificara nas raízes. As actividades da NR verificam-se apenas nas folhas tratadas com o produto, apresentado uma actividade assinalável e estável, ao longo das três últimas datas de colheita.

Nas amostras de órgãos florais da cultivar Cobrançosa verificamos uma tendência, semelhante à observada nas folhas e raízes (Figura 23) para um aumento ao longo das datas das actividades da GS. As amostras tratadas evidenciam valores mais elevados do que as amostras não tratadas, novamente exceção feita à 2ª colheita, onde se observa uma inflexão da tendência crescente ao longo do tempo, além de que o valor da actividade na amostra sem o tratamento não é inferior ao valor na amostra dos órgãos tratados. Em relação à enzima NR, observa-se uma tendência semelhante à verificada na Galega, crescendo e voltando a diminuir nas datas finais, apenas nas amostras de órgãos reprodutivos tratadas com bioestimulante. Nas amostras não tratadas a actividade da NR é nula (Fig. 23)



**Figura 21** Actividade média das enzimas NR ( $\mu\text{mol}$  de nitrito por mg proteína total solúvel) e GS ( $\mu\text{mol}$  de glutamil hidroxamato por mg proteína total solúvel) ao longo do período estudado para a cultivar Cobrançosa nas amostras de raiz. O comprimento das linhas de erro é 2x o erro padrão (n=3). Legenda: Raiz C/ - raiz de árvores com bioestimulante aplicado; Raiz S/ - raiz de árvores sem bioestimulante aplicado.

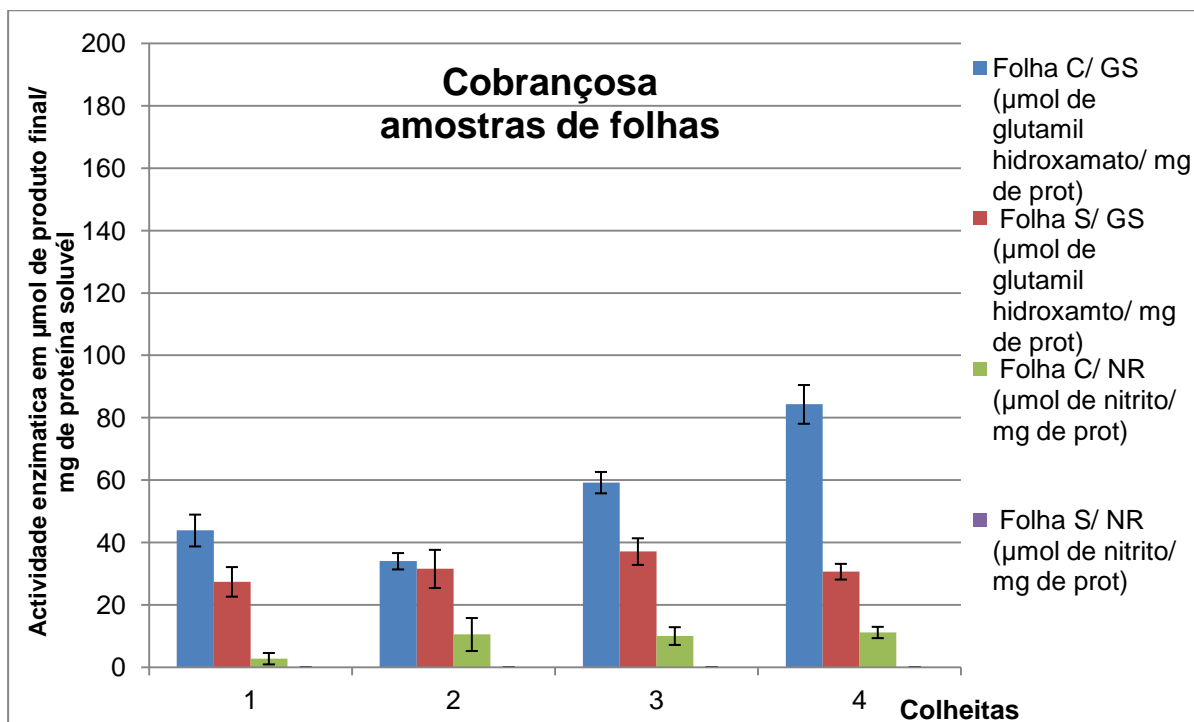


Figura 22 Actividade média das enzimas NR ( $\mu\text{mol}$  de nitrito por  $\text{mg}$  proteína total solúvel) e GS ( $\mu\text{mol}$  de glutamil hidroxamato por  $\text{mg}$  proteína total solúvel) ao longo do período estudado para a cultivar Cobrançosa nas amostras de folha. O comprimento das linhas de erro é 2x o erro padrão ( $n=3$ ). Legenda: Folha C/ - folha com bioestimulante aplicado; Folha S/ - folha sem bioestimulante aplicado.

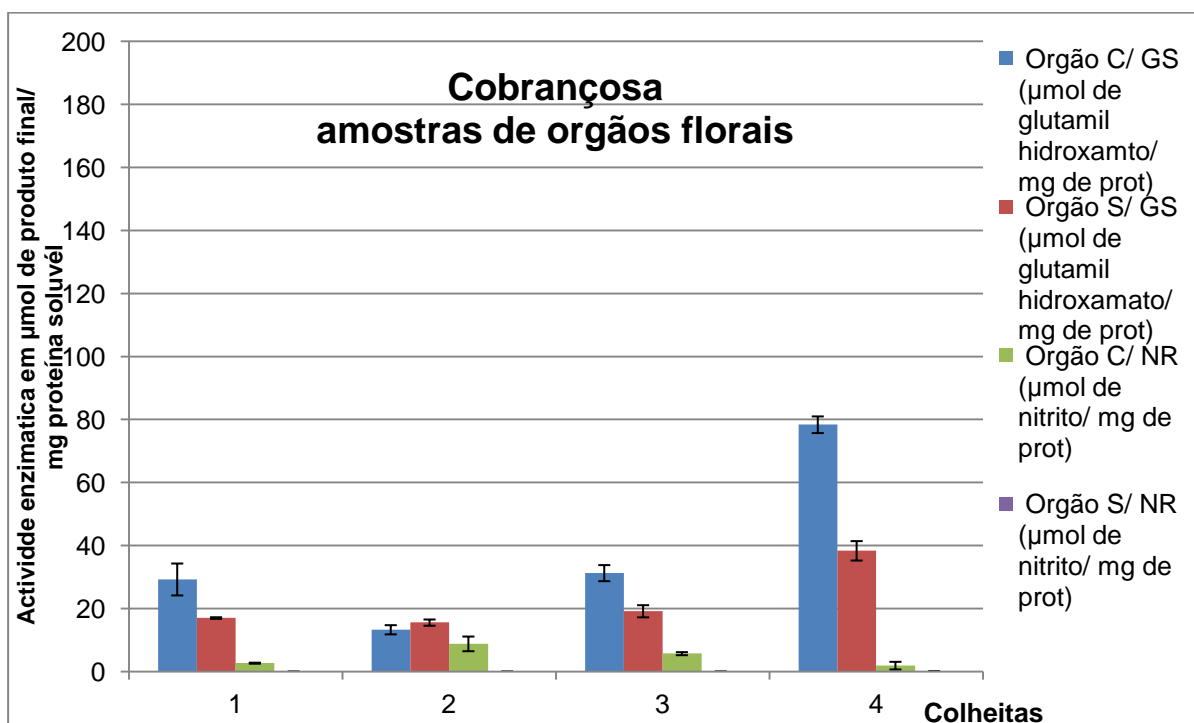


Figura 23 Actividade média das enzimas NR ( $\mu\text{mol}$  de nitrito por  $\text{mg}$  proteína total solúvel) e GS ( $\mu\text{mol}$  de glutamil hidroxamato por  $\text{mg}$  proteína total solúvel) ao longo do período estudado para a cultivar Cobrançosa nas amostras de órgãos florais. O comprimento das linhas de erro é 2x o erro padrão ( $n=3$ ). Legenda: ORG C/ - órgãos florais de árvores com bioestimulante aplicado; ORG S/ - órgãos florais de árvores sem bioestimulante aplicado.

Tal como sugerem as Figuras 21, 22 e 23, a análise estatística revelou que o bioestimulante afecta de forma significativa a actividade da GS nos três órgãos na 3ª e 4ª data (Quadro 9) revelando o teste de Tukey que as amostras tratadas com o extrato de algas apresentaram actividade superior (Anexo I).

Em relação à NR, no caso das raízes, os efeitos da aplicação do produto apenas são significativos na 1ª colheita, visto o valor do *p-value* ser de 0,001 (Quadro 9), revelando o teste de Tukey que as amostras tratadas com o produto bioestimulante apresentavam maior actividade enzimática (Anexo I).

Para o caso das folhas, verifica-se que houve influência da aplicação do bioestimulante nas 3ª e 4ª data, revelando o teste de Tukey que as amostras tratadas apresentavam maior actividade enzimática.

No respeitante aos órgãos florais, o tratamento afecta a actividade da NR nas três primeiras colheitas, revelando o teste de Tukey que as amostras tratadas apresentam maior actividade enzimática (Anexo I)

**Quadro 9 Resumo dos resultados da análise estatística de comparação entre aplicação ou não de Bioestimulante na cultivar Cobrançosa (a cinzento-escuro salientam-se os *p-value* superiores ao nível de significância).**

Colheita	<i>p-value</i>	GS	NR		GS	NR		GS	NR
<b>1ª 18-5-2012</b>	raiz	0,0685	0,001	folha	0,0773	0,1966	órgão florais	0,0732	0,0001
<b>2ª 25-5-2012</b>	raiz	0,1032	0,278	folha	0,7301	0,1268	órgãos florais	0,2682	0,0191
<b>3ª 1-6-2012</b>	raiz	0,0035	0,238	folha	0,0156	0,0459	órgão florais	0,0194	0,0007
<b>4ª 8-6-2012</b>	raiz	0,0145	0,1562	folha	0,0013	0,0035	órgão florais	0,0006	0,1984

As actividades enzimáticas variam significativamente ao longo das datas (Quadro 10). No caso da GS, este efeito só não foi visível nas amostras de raízes e folhas sem tratamento com bioestimulante.

Os testes de comparação de médias revelaram que a 3ª e 4ª data são significativamente superiores à 2ª data, no caso das amostras de raízes tratadas (Anexo I), que a 4ª colheita é significativamente superior à 2ª data no caso das amostras de folhas e órgãos florais tratados, permanecendo a 3ª e a 1ª com valores intermédios (Anexo I) e que a 4ª data é significativamente superior às restantes no caso dos órgãos não tratados.

No caso da NR, o efeito da data de colheita só foi visível na actividade dos órgãos (Quadro 10). Nos órgãos tratados, a actividade da NR na 2ª data foi significativamente

superior à actividade na 1ª e 4ª. Nos órgãos não tratados, a actividade na 4ª data foi significativamente superior à actividade nas restantes datas (Anexo I).

**Quadro 10** Quadro resumo da análise estatística da aplicação de produto nas diferentes datas de colheita da cultivar Cobrançosa (\*a cinzento-escuro salientam-se os *p-value* superiores ao nível de significância).

p-value	GS	NR
raiz C/	0,002	0,2956
raiz S/	0,4216	0,0891
folha C/	0,0003	0,3489
folha S/	0,5415	0,1508
órgão C/	0,00	0,0244
órgão S/	0,0001	0,0012

### 3.8. Produção

Os resultados da produção estão descritos no Quadro 11, onde podemos facilmente verificar que na primeira linha não se evidenciam diferenças significativas entre as produções das árvores tratadas e as das não tratadas. Porém, na segunda linha em que se colheu a azeitona, obtiveram-se produções em Kg por planta consideravelmente mais altas nas árvores tratadas com o bioestimulante.

**Quadro 11** Dados de Produção.

	Dados de produção	Árvores colhidas	Dados de produção Kg de azeitona/planta
1ª linha	Com dose dupla de aplicação de bioestimulante Galega	56	15,18
1ª linha	Sem dose dupla de aplicação de bioestimulante Galega	56	15,45
1ª linha	Com dose dupla de aplicação de bioestimulante Cobrançosa	8	8,81
1ª linha	Sem dose dupla de aplicação de bioestimulante Cobrançosa	14	8,92
2ª linha	Com dose dupla de aplicação de bioestimulante Galega	52	12,68
2ª linha	Sem dose dupla de aplicação de bioestimulante Galega	49	5,89
2ª linha	Com dose dupla de aplicação de bioestimulante Cobrançosa	5	15,5
2ª linha	Sem dose dupla de aplicação de bioestimulante Cobrançosa	20	2,55

## 4. Discussão de resultados

É de extrema importância desde logo referir na discussão de resultados deste trabalho a assimetria dos resultados obtidos nas actividades enzimáticas nas diferentes amostras de raízes, folhas e órgãos florais, concluindo-se que há grande variabilidade dentro de cada modalidade, que os diferentes órgãos apresentam actividades diferentes e que o bioestimulante afecta de forma distinta os diferentes órgãos da planta. A justificar tal facto podemos referir que as árvores utilizadas na colheita de material vegetal apresentam diferenças entre si, tais como o seu estado fisiológico, estado nutricional distinto, cargas florais diferentes, determinando por isso importantes diferenças nas relações *source/sink*. Os estados fisiologicamente diferentes conduzem também a reacções metabólicas mais ou menos intensas, repercutindo-se na fenologia das plantas, tal como pudemos observar nas duas cultivares estudadas. A colheita das amostras neste ensaio ocorreu durante aproximadamente cerca de 30 dias, constituindo o intervalo de tempo decorrido entre colheitas também um factor de variabilidade entre as árvores de cada modalidade. De colheita para colheita variam parâmetros como temperatura e luminosidade, que afectam directamente a fenologia e o metabolismo, incluindo as actividades enzimáticas envolvidas nos mecanismos de assimilação do azoto. A colheita das amostras é um acto de extraordinária importância que pode provocar alterações nas actividades enzimáticas. Ao serem colhidas as amostras neste trabalho, procurou-se colher folhas mais jovens, pois é em folhas mais jovens que a actividade enzimática é comprovadamente superior (Hewitt (1970) citado em Mengel e Kirkby (2001); Van Egmond e Breteler (1972) citados em Mengel e Kirkby (2001). Também a colheita de raízes se efectuou tendo em atenção a recolha de raízes mais finas e menos suberificadas, já que a actividade da NR tem um declínio expressivo nas partes radiculares mais velhas. Este facto apareceu documentado num estudo realizado por Mugnai *et al.* (2008), em que se verificou a melhoria na absorção na parte da raiz que dista cerca de 0,8 a 1,1 mm do ápice radicular. A nível da NR, é nas folhas que se observam valores mais altos seguidos dos órgãos florais e, por último, as raízes com as menores actividades enzimáticas. A nível da GS, são os órgãos florais que apresentam maior actividade, seguido das folhas e, novamente por último, as raízes com as menores actividades. Podemos concluir que, tendencialmente, as raízes são os órgãos que apresentam menor actividade enzimática quer a nível da GS tal como da NR, os órgãos florais a manifestar maior actividade a nível da GS e as folhas a apresentar maior actividade a nível da NR.

Também o método de extracção utilizado pode não ter sido o mais adequado a materiais de plantas lenhosas, que oxidam facilmente. Em futuros trabalhos poderá ser útil aumentar a quantidade de antioxidante no tampão de extracção, ou mesmo os passos de

centrifugação, para eliminar do extracto proteico potenciais inibidores das actividades enzimáticas.

Verificou-se tanto para a cultivar Galega como para a Cobrançosa uma diferente evolução das actividades enzimáticas nos diferentes órgãos analisados. Em relação à actividade da GS nas raízes, na cultivar Galega esta não se apresenta com uma tendência clara, oscilando sem orientação definida, não se verificando efeito positivo da aplicação do bioestimulante. Na cultivar Cobrançosa o mesmo não se verifica, à excepção da 1ª e 2ª colheitas, os valores das actividades enzimáticas demonstram como benéfico o efeito do produto bioestimulante. Em ambas as cultivares, no caso das raízes, os valores médios das actividades para a NR verificaram-se inferiores em relação aos restantes órgãos analisados, o que se pode justificar com o insuficiente teor de nitrato no solo, que não permite que a enzima seja induzida e desempenhe a sua função correctamente. Além do facto de esta enzima NR ser algo instável, esta é induzida pelo seu substrato durante um período de tempo não muito longo, o que pode provocar um desfasamento entre as colheitas e a actividade da enzima.

Nas folhas e no caso da cultivar Galega, as actividades da NR e da GS apresentam valores médios mais elevados e mantêm-se mais constantes ao longo da evolução das colheitas, os fenómenos climáticos e a evolução dos estados fenológicos não apresentam neste caso uma influência evidente nas actividades. No entanto é de referir que para a actividade observada da GS nas três últimas colheitas, apesar do valor médio das amostras tratadas ser superior ao das amostras não tratadas, não se evidenciam quaisquer efeitos benéficos do tratamento com o bioestimulante. No referente à NR, os valores apresentam-se também muito estáveis, não evidenciando qualquer efeito benéfico do tratamento com o bioestimulante. O mesmo não sucede com as actividades da NR na cultivar Cobrançosa, em que as folhas tratadas na 3ª e 4ª data de colheita com o produto demonstram actividades significativamente superiores às actividades observadas nas folhas não tratadas; também a nível da actividade da GS, à excepção da 1ª e 2ª colheita, os valores das amostras tratadas apresentam-se significativamente superiores, evidenciando a influência benéfica do produto. O bom estado sanitário das plantas e as boas condições de luminosidade induzem a uma boa capacidade fotossintética por parte da planta, conduzindo a um bom desempenho das enzimas GS e NR nas folhas, o que se verificou na cultivar Cobrançosa. Devemos também tomar em consideração as diferenças de vigor entre as duas cultivares estudadas, facto este que pode consideravelmente afectar a actividade enzimática das plantas. A cultivar Galega é uma cultivar bastante rústica e mais vigorosa que a Cobrançosa. Deste modo é justificável a menor resposta da cultivar Galega ao tratamento, visto apresentar uma actividade metabólica mais elevada, não apresentando uma resposta tão imediata ao fornecimento de

nutrientes por parte do bioestimulante. Já a cultivar Cobrançosa, sendo menos vigorosa e com menor actividade metabólica, pode ter os substratos em menor quantidade, resultando a aplicação do bioestimulante numa resposta mais pronta.

A alternância de produção é uma característica da oliveira que pode justificar também as diferenças de actividades enzimáticas verificadas entre as cultivares. É de referir que a cultivar Galega é uma cultivar bastante produtiva e alternante, não sucedendo o mesmo com a cultivar Cobrançosa, que é uma cultivar bastante mais regular na produção. O fenómeno da alternância provoca alterações na planta a diversos níveis tais como: diferenças a nível nutricional, diferenças de cargas florais na planta e consequentes diferenças nas relações *source/sink*. A alternância da oliveira afecta a sua produção total que pode ser afectada em menor ou maior escala consoante o ano agrícola for ou não desfavorável a nível climático. No presente trabalho, os efeitos da alternância não foram descurados, no entanto os mesmos não foram analisados de modo a perceber-se a profundidade da sua influência neste trabalho.

A actividade da NR nos órgãos analisados aumenta significativamente para a cultivar Cobrançosa apenas nas amostras tratadas, pressupondo-se aí o efeito do bioestimulante na actividade da NR. Na cultivar Galega, os valores das amostras tratadas e das não tratadas sobem igualmente, não sendo claro neste caso a influência do bioestimulante. Ambas as cultivares estudadas apresentaram na 2ª colheita a 25-05-2013 (Galega estado fenológico 67 e Cobrançosa estado fenológico 69) um pico de actividade enzimática da NR nos órgãos florais, pico este mais expressivo na cultivar Galega. Estas variações podem estar relacionadas com o estado fenológico, ou seja, o fim da floração e início do vingamento dos frutos, seguido da abscisão dos ovários não fecundados. Neste período, a planta altera a sua relação *sink/source*, retirando o destino dos fotoassimilados do crescimento dos ápices, remetendo mais intensamente o mesmo fluxo para o desenvolvimento das estruturas reprodutivas e sucessivo vingamento, o que pode levar a um aumento da actividade da NR. O efeito deste produto sobre a actividade da NR parece tornar-se assim menos marcado aquando dos frutos já em crescimento, face à descida dos valores da actividade da NR nas duas cultivares nas restantes datas de colheitas. Aparentemente, os efeitos na NR são mais notáveis neste curtíssimo mas fulcral período de tempo, especificamente entre a floração e o vingamento. A evolução do crescimento dos frutos provoca uma acumulação de compostos que inibem a actividade da enzima NR, de entre estes compostos pode referir-se os polifenóis, de entre outros. Simultaneamente, verificou-se uma inflexão da tendência de aumento apresentada pela GS. Esta evolução pode também estar relacionada com a fenologia: ao concentrar-se a actividade nos órgãos florais, poderá haver menor actividade de assimilação do azoto amoniacal directo e isso contribuir para uma diminuição da

actividade da GS. As duas enzimas por nós estudadas GS e NR, são parte integrante do mecanismo de assimilação de azoto, usando o azoto amoniacal e o azoto nítrico, respectivamente, como substratos para o seu funcionamento. Assim, a disponibilidade no solo de cada uma das formas de azoto e as proporções em que as mesmas se encontram são bastante importantes, afectando bastante a actividade das enzimas NR e GS. O facto da GS usar como substrato o azoto amoniacal directamente absorvido e o que provém da conversão do nitrito pela NR não nos permite relacionar directamente as actividades das duas enzimas. A aplicação de ureia no olival, efectuada após a 1ª colheita, pode justificar a crescente actividade da GS a partir da 2ª colheita, utilizando possivelmente a GS um substrato alternativo fornecido pela aplicação de ureia. Este aspecto reitera mais uma vez a impossibilidade de estabelecer uma relação directa entre a evolução da actividade da GS e a evolução de actividade da NR, pelo que se deve concluir que a GS é um indicador pouco objectivo do efeito do tratamento com este bioestimulante nas cultivares estudadas. Verificou-se também nesta data uma baixa de temperatura brusca, podendo esta determinar uma baixa de actividade na planta que se repercutiu também na actividade enzimática justificando a inflexão apresentada pela GS na 2ª data de colheita. A oliveira é uma planta que é fortemente afectada pelas baixas temperaturas, agravando-se este efeito negativo com a rapidez na baixa de temperatura, o que se verificou na 2ª data a 25-05-2012.

O colega João Soares Lopes em 2011 realizou uma tese de mestrado em Engenharia Agronómica em que testou o efeito do mesmo produto bioestimulante em oliveiras das cultivares Galega e Cobrançosa, fazendo duas aplicações da dose simples recomendada de produto e analisou os efeitos dessa estratégia. Constatou que o bioestimulante não causou qualquer efeito nas actividades enzimáticas na cultivar Galega quer nas amostras de folhas quer de órgãos florais (Lopes, 2011). Resultados idênticos foram apurados por nós para todas as amostras de órgãos florais, e amostras de folhas. Soares Lopes verificou um aumento da actividade enzimática aquando do desenvolvimento inicial do fruto (estado fenológico 71), o que também foi por nós verificado na 2ª colheita de amostras de órgãos florais (no estado fenológico 67) a nível da actividade da NR; já a nível da GS, no nosso trabalho, esta apresentou tendência crescente ao longo do tempo (com a excepção já referida da 2ª data), verificando-se a 6ª colheita com média superior às restantes. Em relação à cultivar Galega, tal como Lopes (2011), os resultados por nós obtidos não demonstram um efeito marcado do produto bioestimulante na cultivar Galega.

No referente à cultivar Cobrançosa, Lopes (2011) verificou um aumento significativo na actividade de ambas as enzimas nos órgãos reprodutivos, com a aplicação de bioestimulante, na fase inicial de desenvolvimento do fruto (estados fenológicos 68 a 71). Também foi por nós observado, nesta mesma cultivar, efeitos positivos da aplicação do



bioestimulante na actividade da NR e da GS nos órgãos florais. No referente à actividade da NR, verificamos na cultivar Cobrançosa, efeitos do bioestimulante na actividade enzimática nos órgãos reprodutivos na 1ª, 2ª e 3ª colheitas (estados fenológicos 65 e 71, respectivamente), ou seja, aquando do vingamento e crescimento inicial do fruto, verificando-se concordância com os resultados de Lopes (2011). Neste estudo verificamos, em ambas as cultivares, que a actividade da NR nos órgãos florais ocorreu apenas na fase de vingamento e início de crescimento do fruto, desaparecendo quase por completo na fase seguinte. O mesmo foi verificado por Lopes (2011), que também constatou a diminuição da actividade da NR após o crescimento inicial do fruto. No mesmo estudo, Lopes (2011) concluiu que, apesar de climaticamente o ano se apresentar desfavorável, o bioestimulante provocou um efeito benéfico sobre o número de frutos vingados. De igual modo, também num estudo realizado por Basak (2008) se evidenciaram efeitos positivos da aplicação de Goëmar na macieira, traduzidos por uma melhoria na qualidade das flores e prolongamento do período de floração em todas as modalidades por si estudadas, atestando o efeito positivo nos órgãos florais. Os resultados obtidos por Lopes (2011) para a cultivar Galega comparados com os resultados obtidos neste trabalho são concordantes, podendo concluir-se que não se verificam diferenças entre a dupla aplicação em dose normal do produto, com a aplicação única em dose dupla estudada neste trabalho.

Já na cultivar Cobrançosa, Lopes (2011) verificou, tal como no presente trabalho, efeitos positivos nos órgãos florais que não foram acompanhados por efeitos a nível de amostras de folhas; no presente trabalho, os efeitos da aplicação do produto na cultivar Cobrançosa fizeram sentir-se a nível dos órgãos e das folhas, coincidindo os estados fenológicos em que esses efeitos se demonstraram. Podemos deste modo concluir que os efeitos na cultivar Cobrançosa da aplicação deste bioestimulante são mais notórios e que a aplicação única em dose dupla nesta cultivar provoca uma resposta mais expressiva nas actividades enzimáticas.

Graça, em 2012, num trabalho realizado no âmbito do Projecto Final da Licenciatura em Biologia, efectuou duas aplicações com a dose recomendada normal de bioestimulante à cultivar Cobrançosa e constatou que a actividade da NR foi sempre muito baixa ao longo de todas as datas de colheita; já a actividade da enzima GS verificou-se pouco oscilante entre as diferentes datas de colheita.

Nas amostras de raiz das árvores da cultivar Cobrançosa, Graça não verificou qualquer diferença significativa entre as diferentes datas, o mesmo não se verificando neste trabalho para as raízes com tratamento de bioestimulante. Em semelhança aos resultados por nós obtidos, também Graça não verificou diferenças entre datas nas folhas não tratadas. Assim como no presente trabalho, também no trabalho de Graça (2012), as actividades

enzimáticas quer nos órgãos tratados quer nos órgãos não tratados variam significativamente ao longo das datas. Quanto ao efeito da aplicação do bioestimulante na actividade enzimática, Graça apenas verificou efeitos significativos do produto na GS nas amostras tratadas de órgãos florais numa colheita a 25-05-2012, em que as plantas se encontravam no estado fenológico 67, e efeitos na actividade da NR nas amostras tratadas de órgãos florais a 01-06-2012, no estado fenológico 69. No geral, o efeito do bioestimulante não produziu efeitos assinaláveis nas actividades das enzimas NR e GS. No presente trabalho verificou-se um efeito mais claro, visto que o bioestimulante afecta de forma significativa a actividade da GS nos três órgãos na 3ª e 4ª colheitas, também na NR se verificou efeitos nas amostras de raiz na 1ª colheita, nas folhas nas últimas duas colheitas e nos órgãos florais nas três primeiras colheitas, apresentando as amostras tratadas sempre maior actividade enzimática. No trabalho de Graça verificam-se actividades enzimáticas muito baixas, por vezes inexistentes ou não detectáveis pela metodologia utilizada, especialmente no caso da NR, mas também em algumas colheitas a GS. Os efeitos das duas aplicações de produto em dose simples, como experimentado por Graça, não provocaram alterações assinaláveis nas actividades enzimáticas nos órgãos analisados. Verificando os resultados do presente trabalho e comparando-os com os resultados obtidos por Graça, podemos referir que o efeito do bioestimulante na cultivar Cobrançosa é mais marcado nas actividades enzimáticas aquando da aplicação única com dose dupla do produto como realizado no presente trabalho, apresentando em várias colheitas e em vários órgãos as amostras tratadas valores superiores no respeitante às actividades enzimáticas quer da GS quer da NR. O extrato de algas Goemar aplicado a macieira numa experiência realizada na Polónia, provocou uma melhoria no fenómeno de frutificação além de incrementar o diâmetro em cerca de 2-3 mm, melhorando assim a distribuição de maçãs por classes de calibre, possibilitando, consequentemente, aumento da produtividade comercial em cerca de 8% a 11% (Basak, 2008). Os dados de produção por nós obtidos apresentam uma interessante particularidade, das duas linhas em que se colheu a azeitona separadamente, verificam-se na 1ª linha diferenças pouco significativas entre as árvores tratadas e as árvores não tratadas com o bioestimulante nas duas variedades. Já na 2ª linha não se verifica o mesmo, existindo uma grande diferença de produção das árvores tratadas para as não tratadas em ambas as variedades estudadas. A justificar as diferentes produções, podemos mencionar possíveis diferenças a nível de solos e a nível fitossanitário. Ao ocorrerem diferenças a nível de solos na parcela em que as plantas estão implantadas, estas conduzem a alterações à dispersão radicular, interferindo na absorção de água e nutrientes, ou mesmo a dificuldades de drenagem com consequente encharcamento, problemas estes que podem provocar alterações nas produções das plantas. Os problemas fitossanitários que se verificavam no olival tais como o olho de pavão e a gafa provocaram

graves quebras de produção, podendo tais problemas terem afectado diferencialmente as árvores nas linhas em que se colheu a produção, dando origem aos resultados obtidos. Não obstante, é de salientar a observação de um efeito positivo do bioestimulante, o que já acontecera com Lopes (2011), que verificou um efeito benéfico do bioestimulante aplicado sobre o número de frutos vingados na cultivar Galega.

## **4.1. Conclusões**

Com a elaboração deste trabalho, podemos concluir em primeiro lugar que este produto bioestimulante apresenta efeitos positivos sobre a actividade da enzima NR no caso das amostras de folhas e órgãos reprodutivos da cultivar Cobrançosa; contudo, nas raízes as actividades são bastante baixas verificando-se efeitos benéficos apenas na primeira colheita de amostras. Já na cultivar Galega não se verificam efeitos positivos do bioestimulante sobre a actividade da enzima NR. A actividade da enzima GS na cultivar Cobrançosa é notavelmente influenciada pela aplicação do produto nas duas últimas colheitas nas amostras de folha, órgão e raiz. No referente à actividade da enzima GS na cultivar Galega, os resultados obtidos nas amostras revelam que a aplicação de bioestimulante não afecta as actividades da enzima GS. O efeito do produto bioestimulante é mais acentuado na cultivar Cobrançosa do que na cultivar Galega, talvez por esta cultivar possuir características genéticas, tais como rusticidade e forte vigor, que determinam um efeito do produto bioestimulante com aplicação única em dose dupla menos assinalável do que na cultivar Cobrançosa. O estado fenológico da cultura, em conjunto com factores climáticos, com particular destaque para a evolução das temperaturas, exercem forte influência nas actividades enzimáticas quer da GS quer da NR. A evolução da fenologia poderá explicar o pico de actividade da NR que ocorreu nos órgãos florais na 2ª colheita em ambas as cultivares. O declínio pontual da GS poderá estar relacionado com a baixa de temperatura que se verificou na altura da colheita. Podemos concluir que a influência climática é determinante, dado poder ser favorável ao efeito do produto assim como pode retardar os seus efeitos consoante interfere no metabolismo da planta.

A actividade da enzima GS deve ser analisada com a devida cautela, visto a mesma poder funcionar com substratos de diferentes origens, concluindo-se portanto que não podemos relacionar a sua actividade com a actividade da NR. Apurou-se que a correcta colheita das amostras no campo é de extrema importância, visto o perigo de colheita accidental de raízes procedentes de outras plantas induzir a resultados enganosos. Comparando os resultados obtidos na cultivar Cobrançosa por Graça (2012), a dupla aplicação em dose simples por ele efectuada não apresentou efeitos muito assinaláveis nas actividades das enzimas NR e GS, o mesmo não se verifica no presente trabalho visto que o bioestimulante afectou de forma positiva a actividade da GS e da NR, apresentando as amostras tratadas genericamente maior actividade enzimática. Podemos portanto concluir que a aplicação única da dose dupla de produto bioestimulante foi na cultivar Cobrançosa mais eficiente na promoção da actividade de ambas as enzimas. O mesmo podemos concluir ao comparar os resultados obtidos na cultivar Cobrançosa no trabalho realizado por Lopes (2011) em que, mais uma vez, a aplicação única em dose dupla se evidencia mais benéfica na actividade enzimática. Já na cultivar Galega, Lopes (2011) concluiu que a

aplicação de produto bioestimulante não causou qualquer efeito nas actividades enzimáticas quer nas amostras de folhas quer de órgãos florais. O mesmo foi por nós verificado, concluindo-se que a cultivar Galega não foi afectada pela aplicação única em dose dupla de bioestimulante. Uma alargada análise sobre a vantagem económica proporcionada pela utilização deste produto verifica-se de especial interesse. Contudo, esta análise não deveria descurar obviamente os factores externos de produção tais como o estado sanitário e nutritivo da planta, além de todas as variáveis climáticas.

## 5. Referencias Bibliográficas

- Agusti, M. 2004. Fruticultura. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, 493 pp.
- Basak, A. 2008. Effect of Preharvest Treatment with Seaweed Products, Kelpak and Goemar BM 86, on Fruit Quality in Apple. *International Journal of Fruit Science*, 8(1-2) 2008.
- Barranco, D., Fernandez-Escóbar, R. Rallo, L. 1999. *El cultivo del olivo*. 3ª Edição. Madrid: Mundi-Prensa, 1999. 701 pp.
- Barranco, D., Fernández-Escobar, R., Rallo, L. 2008. *El cultivo del Olivo*. Ediciones Mundi-Prensa y Junta de Andalucía, Madrid. 846 pp.
- Bradford, M.M. 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248–254.
- Blunden, G., Jenkins, T., Liu, Y.W., 1996. Enhanced leaf chlorophyll levels in plant treated with seaweed extract. *Journal of Applied Phycology* 8: 535-543.
- Azeite, Casa do. 2011. Casa do Azeite. <http://www.casadoazeite.pt/> consultado em 23-10-2012
- Cabral, Érica. 2010. Estudos preliminares de polinização em oliveira (*Olea europaea* L.) cv. Galega vulgar. Horticultura, Instituto Superior de Agronomia. Lisboa 2010. 62 pp.
- Chatzissavvidis, C.A., Therios I.N., Antonopoulou, C. 2004. Seasonal variation of nutrient concentration in two olive (*Olea europaea* L.) cultivars irrigated with high boron water. *J. Hort. Sci. Biotechnol.* 79:683-688.
- Chouliaras, V., Tasioula, M., Chatzissavvidis, C., Therios, I., Tsabolatidou, E. 2009. The effects of a seaweed extract in addition to nitrogen and boron fertilization on productivity, fruit maturation, leaf nutritional status and oil quality of the olive (*Olea europaea* L.) cultivar Koroneiki. *J. Sci Food Agric* 89: 984-988.
- Cimato A., Marranci M., Tattini M. 1990. The use of foliar fertilization to modify sinks competition and to increase yield in olive (*Olea Europaea* cv Frantoio). *Acta Horticulturae* ; 286.
- Colavita G. M., Spera N. B., Sepulveda V. G. M. 2011. Effect of seaweed extract on pear fruit quality and yield. *Acta Horticulturae* ;. 909, 601-607.

Cuevas, J., Rallo, L. and Rapoport, H. 1994. Initial fruit set at high temperature in olive, (*Olea europaea* L.). J. Hort. Sci. 69:665-672.

DGADR. 2010. Produção Integrada do Olival. 2ª Ed. DGADR. 97 pp.

Durand N., Briand X., Meyer C. 2003. The effect of marine bioactive substances (N PRO) and exogenous cytokinins on nitrate reductase activity in *Arabidopsis thaliana*. Physiologia Plantarum 119: 489-493.

Erel, R., Dag, A., Ben-Gal, A., Schwartz, A. and Yermiyahu, U. 2008. Flowering and fruit-set of young olive (*Olea europaea* L. cv. Barnea) trees in response to nitrogen, phosphorus and potassium. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 133:639-647.

Franco-Mora, O., Tanabe, K., Tamura, F., Itai, A. 2005. Effects of putrescine application on fruit set in “Housui” Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai), Scientia Horticulturae 104 265-273 Eds. A.D. Webster and H. Ramirez Proc. X<sup>th</sup> IS on Plant Bioregulators in Fruit.

Fernandez-Escóbar, R., Moreno, R., García-Creus M. 1999. Seasonal changes of mineral nutrients in olive leaves during the alternate-bearing cycle. Scientia Horticulturae 82 25-45.

Fernandez-Escóbar, R., Benlloch, M., Herrera, E., García-Novelo, J.M. 2004.a Effect of traditional and slow-release N fertilizers on growth of olive nursery plants and N losses by leaching. Scientia Horticulturae 101:39-49.

Fernandez-Escóbar, R., Moreno, R., Sánchez-Zamora, M.A., 2004b. Nitrogen dynamics in the olive bearing shoot. HortScience 39 (6):1406-1411.

Fernandez-Escóbar, R., Beltrán, G., Sánchez-Zamora, M.A., García-Novelo, J., Aguilera, M.P., Uceda, M. 2006. Olive oil quality decreases with nitrogen over-fertilization. HortScience 41 (1): 215-219.

Fernández-Escobar, R., Moreno, R. and Sánchez-Zamora, M.A. 1994b. Nitrogen dynamics in the olive bearing shoot. HortScience 39(6):1406-1411.

Fernández-Escobar, R., Ortiz-Urquiza, A., Prado, M., Rapoport, H.F. 2008. Nitrogen status influence on olive tree flower quality and ovule longevity. Environmental and Experimental Botany 64: 113-119.

Fernández-Escobar, R. 1997. Fertilización. In: D. Barranco, R. Fernández-Escobar and L. Rallo (eds.), El cultivo del olivo, 1ª ed., Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, 605p.

Fernandez-Escobar, R., Garcia-Novelo, J. M., Restrepo-Diaz, H. 2011. Mobilization of nitrogen in the olive bearing shoots after foliar application of urea. *Scientia Horticulturae*; 127: 3, 452-454. 11 ref.

Fernandez-Escobar, R., Garcia-Novelo, J. M., Parra, M.A. 2012. An approach to nitrogen balance in olive orchards. *Sci. Hort.* 135, 219-226.

Fernández-Escobar, R., Marin, L., Sánchez-Zamora, M.A., García-Novelo, J.M., Molina-Soria, C., Parra, M.A. 2009. Long-term effects of N fertilization on cropping and growth of olive trees and on N accumulation in soil profile. *European Journal of Agronomy* 31: 223-232.

Gabinete de Planeamento e Políticas, Ministério da Agricultura, do Mar, do Ambiente e do Ordenamento do Território  
[http://www.gpp.pt/pbl/diagnosticos/azeite\\_\\_diagnostico\\_sectorial.pdf](http://www.gpp.pt/pbl/diagnosticos/azeite__diagnostico_sectorial.pdf) consultado em 20-09-2012

García, A. 2005. Cultivo moderno do Olival. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid. 295 pp.

Graça, D. 2012. Efeitos da aplicação de extrato de algas na atividade enzimática em Oliveiras da cultivar Cobrançosa. Lisboa : Instituto Superior de Agronomia. 2012. 55 pp.

Glass, A.D.M., Britto, D.T., Kaiser, B.N., Kinghorn, J.R., Kronzucker, H.J., Kumar, A., Okamoto, M., Rawat, S., Siddiqi, M.Y., Unckels, S.E., Vidmar, J. 2002. The regulation of nitrate and ammonium transport systems in plants. *Journal of Experimental Botany* 53: 370.

Goëmar - Laboratoire de la mer. Brochure do producto. *Brochure do produto*  
International Olive Council <http://www.internationaloliveoil.org/> consultado em 20-09-2012

IPMA, Instituto Português do Mar e da Atmosfera  
<http://www.ipma.pt/pt/oclima/servicos.clima/index.jsp?page=atlas.clima.xml> consultado em 05-12-2012

Jannin, L., Arkoun, M., Etienne, P., Laîné, P., Groux, D., Garnica, M., Fuentes, M., Francisco, S. S., Baigorri, R., Cruz, F., Houdusse, F., Garcia-Mina, J.M., Yvin, J.C., Ourry, A. 2012 *Brassica napus* Growth is Promoted by *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jol. Seaweed Extract: Microarray Analysis and Physiological Characterization of N, C, and S Metabolisms. *J. Plant Growth Regul.* (2013) 32:33-52.



Kaiser, J., Lewis, O. (1984). Nitrate reductase and glutamine synthetase activity in leaves and roots of nitrate-fed *Helianthus annuus* L. Plant Soil 70:127-130.

Kelly, S., Munk D. S., J. F. Wroble. 2006. Crop Performance evaluations of Goemar BM86 on Acala and Pima Stephen Kelly, Agrimar corp. University of California Fresno, CABeltwide Cotton Conferences, San Antonio, Texas-January 3-6, 2006.

Lancien M., Gadal P., Hodges M. Enzyme. 2000 Redundancy and the Importance of 2-Oxoglutarate in Higher Plant ammonium Assimilation. Plant Physiol. July 2000 Vol. 123, pp.817-824. American Society of Plant Physiologists.

Leitão, P.A., Potes, M.F., Calado, M.F., Almeida, F.J. 1986. Descrição de 22 Variedades de Oliveira Cultivadas em Portugal.- Lisboa: DGPA. 111pp.

Liu, X.Q., Ko, K.Y., Kim, S.H., Lee, K.S. 2008. Effect of amino acid fertilization on nitrate Assimilation of Leafy Radish and Soil Chemical Properties in High Nitrate Soil. Soil and Plant Analysis. 39: 269-281.

Lopes, J. 2011. Polinização em oliveira cvs. Galega e Cobrançosa: avaliação do vingamento em ensaios de polinização controlada e do efeito da aplicação de um bioestimulante. Lisboa: Instituto Superior de Agronomia. 2011. 104 pp.

López-Villalta L. 1996. Técnicas de produção. In: Enciclopédia Mundial del Olivo. Madrid: Consejo Oleícola Internacional. 159-162 Enciclopédia Mundial da Oliveira.

Loussert, R., Brousse, G. 1980. *El olivo*. Madrid : Mundi-Prensa, 1980. 533 pp.

Marshner, H. 1995. *Mineral nutrition of higher plants*. Institut of Plant Nutrition, University of Hohenheim Germany. 1995. 904 pp.

Mengel, K., Kirkby, E.A. 2001. Principles of plant nutrition. Ed 5. Kluwer Academic Publishers, NL. 894 pp.

Mifflin, B.J., Habash ,D.Z. 2002. The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement in the nitrogen utilization of crops. Journal of Experimental Botany. 52: 541-549.

Miller, A.J., Cramer, M.D. 2004. Root nitrogen acquisition and assimilation. Plant and soil 274: 1-36.

Miller, B.D., Hawkins, B.J. 2007. Ammonium and nitrate uptake, nitrogen productivity and biomass allocation in interior spruce families with contrasting growth rates and mineral nutrient preconditioning. *Tree Physiology* 27: 901-909.

Miller, A.J., Fan, X., Shen, Q., Smith, S. 2007. Amino acids and nitrate signals for the regulation of nitrogen acquisition. *Journal of Experimental Botany* 59: 111-119.

Milheiro, A. Vaz. 1982. A fertilização da oliveira. Nº1 Olivicultura Direcção Geral da Extensão Rural Ministério da Agricultura, Comércio e Pescas. 29 pp.

Moller, M., Smith, M.L. 1998. Significance of Mineral Component of Seaweed Suspensions on Lettuce (*Lactuca sativa* L.). Seedling Growth *J. Plant Physiol.* (1998) Vol.153. pp. 658-663.

Molina-Soria, C., Fernández-Escobar, R. 2012. A Proposal of New Critical Leaf Nitrogen Concentrations in Olive. *Acta Hort.* 949, ISHS Proc.VI<sup>th</sup> IS on Olive Growing.

Mugnai, S., Azzarello, E., Pandolfi, C., Salamagne, S., Briand, X., Mancuso, S. 2007. Enhancement of ammonium and potassium root influxes by the application of marine bioactive substances positively affects *Vitis vinifera* plant growth. *J. Appl. Phycol.* (2008) 20:177-182.

Neto, Cláudia. 2007. Estudo da dinâmica do azoto em pereira (*Pyrus communis* L.). Lisboa: Instituto Superior de Agronomia, 2007.

Nicodemus, M.A., Francis Salifu K., Jacobs, D.F. 2008. Nitrate reductase activity and nitrogen compounds in xylem exudate of *Juglans nigra* seedlings: relation to nitrogen source and supply. *Trees* 22: 685-695.

Norrie, J., Phillip Keathley J. 2006. Benefits of *Ascophyllum nodosum* Marine-Plant Extract Applications to “Thompson Seedless” Grape Production *Acta Horticulturae* 727, X International Symposium on Plant Bioregulators in Fruit Production.

Osman, S.M., Khamis, M.A., Thorya, A. M. 2010. Effect of Mineral and Bio-NPK Soil application on Vegetative Growth, Flowering, Fruiting and Leaf Chemical Composition of Young Olive Trees. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 6 (1): 54-63.

Perica, S., Brown, P.H., Connell, J.H., Nyomora, A.M.S., Dordas, C., Hening Hu. 2001. Foliar Boron application improves flower fertility and fruit set of olive. *HortScience* 36 (4):714-716. 2001.

- Rathore, S.S., Chaudhary, D.R., Boricha, G.N., Ghosh, A., Bhatt, B.P., Zodape, S. T., Patolia, J.S. 2008. Effect of seaweed extract on the growth, yield and nutrient uptake of soybean (*Glycine max*) under rainfed conditions. *South African of Botany* 75 (2009) 351-355.
- Rapoport, H. F., Perez-Priego, O., Orgaz, F., Martins, P. 2011. Water deficit effects during olive tree inflorescence and flower development. *Acta Horticulturae* 888 157-162. 12
- Rodrigues, M. A., Ferreira, I. Q., Claro, A. M., Arrobas, M. Fertilizer recommendations for olive based upon nutrients removed in crop and pruning. *Scientia Horticulturae* 142 (2012): 205-211.
- Roussos, P.A., Denaxa, N-K., Damvakaris, T. 2008. Strawberry fruit quality attributes after application of plant growth stimulating compounds. *Scientia Horticulturae* 119 (2009) 138-146.
- Sanz-Cortés, F., Martinez-Calvo, J., Badenes, M.L., Bleiholder, H., Hack, H., Llacer, G. e Meier, U. (2002). Phenological growth stages of olive trees (*Olea europaea* L.). *Annals Applied Biology* 140: 151-157.
- Schjoerring, J.K., Husted, S., Mäck, G., Matsson, M. 2002. The regulation of ammonium translocation in plants. *Journal of Experimental Botany* 53: 883-890.
- Silva, A.A.F. 2008. Necessidades hídricas e resposta da oliveira (*Olea europaea* L.) ao deficit hídrico na região da terra quente. Vila Real: Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 2008. 225 pp.
- Silva, M. P.G. 2010. Avaliação da influência da adubação azotada nítrica e amoniacal no crescimento e na actividade de algumas enzimas em oliveiras jovens (*Olea europaea* L. cv Cobrançosa). Lisboa: Instituto Superior de Agronomia, 2010. 63 pp.
- Taiz, L., Zeiger, E. 1998. *Plant Physiology*. Second Edition. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, EUA: 792 pp.
- Therios, I.N. 2006. Mineral nutrition of olive trees. *Proc. 2<sup>nd</sup> Intl. Seminar Recent Advances Olive Industry*. p. 307-316.

Touraine, B., 2004. Nitrate uptake by roots – Transporters and Root Development *In* Amâncio, S., Stulen, I. 2004. Nitrogen Acquisition and Assimilation in Higher Plants. Kluwer Academic Publishers. 1-34.

Turan, M., Kose, C. 2006. Seaweed Extracts Improve Copper Uptake of Grapevine. *Acta Agriculturae Scandinavica Section B-Soil & Plant Science* 54:4,213-220.

Truax, B., Lambert, F., Gagnon, D., Chevrier N.1993. Nitrate reductase and glutamine synthetase activities in relation to growth and nitrogen assimilation in red oak and red ash seedlings: effects of N-forms, N concentration and light intensity. *Trees* 9:12-18.

Varennnes, A. 2003. Productividade dos solos e ambiente. Lisboa : Escolar Editora, 2003.

## Anexo I

(Resultados da análise estatística efectuada)

Statistix 9.0 Galega Folha C/ Evolução nas datas de colheita

Completely Randomized AOV for NR

Source	DF	SS	MS	F	P
V002	5	1856.03	371.206	7.83	0.0005
Error	18	853.62	47.423		
Total	23	2709.65			
Grand Mean	15.260	CV 45.13			

V002 Mean

1	1.313
2	27.300
3	9.364
4	11.058
5	21.226
6	21.302

Observations per Mean 4

Standard Error of a Mean 3.4432

Std Error (Diff of 2 Means) 4.8695

Completely Randomized AOV for GS

Source	DF	SS	MS	F	P
V002	5	3824.8	764.956	0.84	0.5374
Error	18	16351.7	908.425		
Total	23	20176.4			
Grand Mean	74.688	CV 40.35			

V002 Mean

1	60.722
2	66.184
3	60.066
4	84.531
5	86.458

6 90.167  
 Observations per Mean 4  
 Standard Error of a Mean 15.070  
 Std Error (Diff of 2 Means) 21.312

Statistix 9.0 Galega Folha C/ Evolução nas datas de colheita  
 Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of NR by V002  
 V002 Mean Homogeneous Groups

2 27.300 A  
 6 21.302 AB  
 5 21.226 AB  
 4 11.058 BC  
 3 9.3640 BC  
 1 1.3128 C

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 4.8695  
 Critical Q Value 4.495 Critical Value for Comparison 15.477  
 There are 3 groups (A, B, etc.) in which the means  
 are not significantly different from one another.

Statistix 9.0 Galega Folha S/ Evolução nas datas de colheita  
 Completely Randomized AOV for NR

Source	DF	SS	MS	F	P
V002	5	789.25	157.850	3.27	0.0283
Error	18	868.63	48.257		
Total	23	1657.88			

Grand Mean 12.964 CV 53.59

V002 Mean

1 5.749  
 2 21.945  
 3 7.930  
 4 10.234  
 5 18.590  
 6 13.333

Observations per Mean 4  
 Standard Error of a Mean 3.4734  
 Std Error (Diff of 2 Means) 4.9121

Completely Randomized AOV for GS

Source	DF	SS	MS	F	P
V002	5	2622.6	524.512	1.01	0.4408

Error	18	9356.7	519.815		
-------	----	--------	---------	--	--

Total	23	11979.2			
-------	----	---------	--	--	--

Grand Mean 61.013 CV 37.37

V002 Mean

1 71.901

2 47.085

3 64.973

4 67.457

5 68.708

6 45.957

Observations per Mean 4

Standard Error of a Mean 11.400

Std Error (Diff of 2 Means) 16.122

Statistix 9.0 Galega Folha S/ Evolução nas datas de colheita

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of NR by V002

V002 Mean Homogeneous Groups

2 21.945 A

5 18.590 AB

6 13.333 AB

4 10.234 AB

3 7.9300 AB

1 5.7487 B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 4.9121

Critical Q Value 4.495 Critical Value for Comparison 15.612

There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.

Statistix 9.0 Galega Orgão C/ Evolução nas datas de colheita

Completely Randomized AOV for NR

Source	DF	SS	MS	F	P
--------	----	----	----	---	---

V002	5	1718.82	343.763	13.85	0.0000
------	---	---------	---------	-------	--------

Error 18 446.71 24.817  
Total 23 2165.53  
Grand Mean 7.6118 CV 65.45

V002 Mean

1 7.034  
2 24.863  
3 10.026  
4 2.981  
5 0.387  
6 0.380

Observations per Mean 4  
Standard Error of a Mean 2.4908  
Std Error (Diff of 2 Means) 3.5226

Completely Randomized AOV for GS

Source	DF	SS	MS	F	P
V002	5	48839.8	9767.96	49.85	0.0000

Error 18 3526.8 195.93

Total 23 52366.5

Grand Mean 63.034 CV 22.21

V002 Mean

1 43.67  
2 30.42  
3 41.54  
4 51.66  
5 48.10  
6 162.82

Observations per Mean 4  
Standard Error of a Mean 6.9988  
Std Error (Diff of 2 Means) 9.8978

Statistix 9.0 Galega Orgão C/ Evolução nas datas de colheita

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of GS by V002

V002 Mean Homogeneous Groups

6 162.82 A  
4 51.660 B  
5 48.102 B



1 43.670 B  
 3 41.537 B  
 2 30.416 B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 9.8978  
 Critical Q Value 4.495 Critical Value for Comparison 31.458  
 There are 2 groups (A and B) in which the means  
 are not significantly different from one another.

#### Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of NR by V002

V002 Mean Homogeneous Groups

2 24.863 A  
 3 10.026 B  
 1 7.0338 B  
 4 2.9813 B  
 5 0.3873 B  
 6 0.3798 B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 3.5226  
 Critical Q Value 4.495 Critical Value for Comparison 11.196  
 There are 2 groups (A and B) in which the means  
 are not significantly different from one another.

#### Statistix 9.0 Orgão Galega S/ Evolução nas datas de colheita

Completely Randomized AOV for NR

Source	DF	SS	MS	F	P
V002	5	1705.96	341.193	10.17	0.0001
Error	18	603.79	33.544		
Total	23	2309.75			

Grand Mean 6.4537 CV 89.74

V002 Mean

1 6.925  
 2 24.120  
 3 6.798  
 4 0.464  
 5 0.462  
 6 0.048

Observations per Mean 4  
Standard Error of a Mean 2.8959  
Std Error (Diff of 2 Means) 4.0954

#### Completely Randomized AOV for GS

Source	DF	SS	MS	F	P
V002	5	58647.6	11729.5	19.80	0.0000
Error	18	10664.5	592.5		
Total	23	69312.1			
Grand Mean	68.481	CV	35.54		

#### V002 Mean

1	41.03
2	19.85
3	49.45
4	55.30
5	71.91
6	173.34

Observations per Mean 4  
Standard Error of a Mean 12.170  
Std Error (Diff of 2 Means) 17.212

#### Statistix 9.0 Orgão Galega S/ Evolução nas datas de colheita

##### Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of GS by V002

#### V002 Mean Homogeneous Groups

6	173.34	A
5	71.914	B
4	55.297	B
3	49.454	B
1	41.031	B
2	19.846	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 17.212  
Critical Q Value 4.495 Critical Value for Comparison 54.704  
There are 2 groups (A and B) in which the means  
are not significantly different from one another.

#### Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of NR by V002

# V002 Mean Homogeneous Groups

2 24.120 A  
 1 6.9253 B  
 3 6.7980 B  
 4 0.4640 B  
 5 0.4623 B  
 6 0.0478 B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 4.0954  
 Critical Q Value 4.495 Critical Value for Comparison 13.016  
 There are 2 groups (A and B) in which the means  
 are not significantly different from one another.

## Statistix 9.0 Raiz Galega C/ Evolução nas datas de colheita Completely Randomized AOV for NR

Source	DF	SS	MS	F	P
V002	5	683.15	136.631	1.35	0.2898
Error	18	1825.24	101.402		
Total	23	2508.39			
Grand Mean	6.3817	CV 157.79			
V002 Mean					
1	0.313				
2	3.043				
3	0.155				
4	10.972				
5	12.898				
6	10.911				

Observations per Mean 4  
 Standard Error of a Mean 5.0349  
 Std Error (Diff of 2 Means) 7.1205

## Completely Randomized AOV for GS

Source	DF	SS	MS	F	P
V002	5	11814.3	2362.87	4.11	0.0115
Error	18	10337.2	574.29		
Total	23	22151.6			

Grand Mean 38.545 CV 62.17

V002 Mean

1 29.346

2 10.161

3 39.035

4 74.760

5 19.605

6 58.364

Observations per Mean 4

Standard Error of a Mean 11.982

Std Error (Diff of 2 Means) 16.945

Statistix 9.0 Raiz Galega C/ Evolução nas datas de colheita

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of GS by V002

V002 Mean Homogeneous Groups

4 74.760 A

6 58.364 AB

3 39.035 AB

1 29.346 AB

5 19.605 B

2 10.161 B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 16.945

Critical Q Value 4.495 Critical Value for Comparison 53.858

There are 2 groups (A and B) in which the means  
are not significantly different from one another.

Statistix 9.0 Raiz Galega S/ Evolução nas datas de colheita

Completely Randomized AOV for NR

Source	DF	SS	MS	F	P
--------	----	----	----	---	---

V002	5	542.77	108.555	1.22	0.3388
------	---	--------	---------	------	--------

Error	18	1598.05	88.781		
-------	----	---------	--------	--	--

Total	23	2140.83			
-------	----	---------	--	--	--

Grand Mean 6.8227 CV 138.10

V002 Mean

1 2.974

2 9.871

3 0.189  
 4 6.306  
 5 15.023  
 6 6.574

Observations per Mean 4  
 Standard Error of a Mean 4.7112  
 Std Error (Diff of 2 Means) 6.6626

#### Completely Randomized AOV for GS

Source	DF	SS	MS	F	P
V002	5	9836.5	1967.29	11.53	0.0000
Error	18	3070.9	170.61		
Total	23	12907.4			

Grand Mean 37.665 CV 34.68

#### V002 Mean

1 29.742  
 2 9.473  
 3 55.019  
 4 39.395  
 5 22.176  
 6 70.184

Observations per Mean 4  
 Standard Error of a Mean 6.5308  
 Std Error (Diff of 2 Means) 9.2360

#### Statistix 9.0 Raiz Galega S/ Evolução nas datas de colheita

#### Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of GS by V002

#### V002 Mean Homogeneous Groups

6 70.184 A  
 3 55.019 AB  
 4 39.395 BC  
 1 29.742 BCD  
 5 22.176 CD  
 2 9.4725 D

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 9.2360  
 Critical Q Value 4.495 Critical Value for Comparison 29.355

There are 4 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

Statistix 9.0 Galega Caso 1ª Colheita Folha C ou S aplicação

Completely Randomized AOV for NR

Source	DF	SS	MS	F	P
V002	1	39.3562	39.3562	7.80	0.0314
Error	6	30.2612	5.0435		
Total	7	69.6174			

Grand Mean 3.5308 CV 63.61

V002 Mean

c 1.3127

s 5.7488

Observations per Mean 4

Standard Error of a Mean 1.1229

Std Error (Diff of 2 Means) 1.5880

Completely Randomized AOV for GS

Source	DF	SS	MS	F	P
V002	1	249.93	249.929	0.73	0.4255
Error	6	2052.87	342.146		
Total	7	2302.80			

Grand Mean 66.311 CV 27.89

V002 Mean

c 60.722

s 71.901

Observations per Mean 4

Standard Error of a Mean 9.2486

Std Error (Diff of 2 Means) 13.079

Statistix 9.0 Galega Caso 1ª Colheita Folha C ou S aplicação

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of NR by V002

V002 Mean Homogeneous Groups

s 5.7487 A

c 1.3128 B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 1.5880  
 Critical Q Value 3.461 Critical Value for Comparison 3.8861  
 All 2 means are significantly different from one another.

Statistix 9.0 Galega Caso 2ª Colheita Folha C ou S aplicação

Completely Randomized AOV for NR

Source	DF	SS	MS	F	P
V002	1	95.821	95.821	0.79	0.4096
Error	6	732.052	122.009		
Total	7	827.873			

Grand Mean 27.710 CV 39.86

V002 Mean

c 31.171

s 24.249

Observations per Mean 4

Standard Error of a Mean 5.5229

Std Error (Diff of 2 Means) 7.8105

Completely Randomized AOV for GS

Source	DF	SS	MS	F	P
V002	1	808.3	808.34	0.50	0.5068
Error	6	9735.2	1622.54		
Total	7	10543.6			

Grand Mean 51.656 CV 77.98

V002 Mean

c 61.708

s 41.604

Observations per Mean 4

Standard Error of a Mean 20.140

Std Error (Diff of 2 Means) 28.483

Statistix 9.0 Galega Caso 3ª Colheita Folha C ou S aplicação

Completely Randomized AOV for NR

Source	DF	SS	MS	F	P
V002	1	4.113	4.1127	0.17	0.6922
Error	6	142.908	23.8180		
Total	7	147.021			

Grand Mean 8.6470 CV 56.44

V002 Mean

c 9.3640

s 7.9300

Observations per Mean 4

Standard Error of a Mean 2.4402

Std Error (Diff of 2 Means) 3.4509

Completely Randomized AOV for GS

Source	DF	SS	MS	F	P
V002	1	48.16	48.162	0.13	0.7296
Error	6	2201.87	366.978		
Total	7	2250.03			

Grand Mean 62.520 CV 30.64

V002 Mean

c 60.066

s 64.973

Observations per Mean 4

Standard Error of a Mean 9.5783

Std Error (Diff of 2 Means) 13.546

Statistix 9.0 Galega Caso 4ª Colheita Folha C ou S aplicação

Completely Randomized AOV for NR

Source	DF	SS	MS	F	P
V002	1	1.356	1.3563	0.07	0.7999
Error	6	115.881	19.3135		
Total	7	117.238			

Grand Mean 10.646 CV 41.28

V002 Mean

c 11.058

s 10.234



Observations per Mean 4  
Standard Error of a Mean 2.1974  
Std Error (Diff of 2 Means) 3.1075

Completely Randomized AOV for GS

Source	DF	SS	MS	F	P
V002	1	583.03	583.026	3.74	0.1013
Error	6	935.12	155.854		
Total	7	1518.15			

Grand Mean 75.994 CV 16.43

V002 Mean

c 84.531

s 67.457

Observations per Mean 4  
Standard Error of a Mean 6.2421  
Std Error (Diff of 2 Means) 8.8276

Statistix 9.0 Galega Caso 5ª Colheita Folha C ou S aplicação

Completely Randomized AOV for NR

Source	DF	SS	MS	F	P
V002	1	13.897	13.8970	0.60	0.4692
Error	6	139.760	23.2933		
Total	7	153.657			

Grand Mean 19.908 CV 24.24

V002 Mean

c 21.226

s 18.590

Observations per Mean 4  
Standard Error of a Mean 2.4132  
Std Error (Diff of 2 Means) 3.4127

Completely Randomized AOV for GS

Source	DF	SS	MS	F	P
V002	1	630.09	630.090	1.93	0.2146
Error	6	1963.52	327.253		
Total	7	2593.61			

Grand Mean 77.583 CV 23.32

V002 Mean

c 86.458

s 68.708

Observations per Mean 4

Standard Error of a Mean 9.0451

Std Error (Diff of 2 Means) 12.792

Statistix 9.0 Galega Caso 6ª Colheita Folha C ou S aplicação

Completely Randomized AOV for NR

Source	DF	SS	MS	F	P
V002	1	126.986	126.986	1.39	0.2825
Error	6	546.689	91.115		
Total	7	673.675			

Grand Mean 17.317 CV 55.12

V002 Mean

c 21.302

s 13.333

Observations per Mean 4

Standard Error of a Mean 4.7727

Std Error (Diff of 2 Means) 6.7496

Completely Randomized AOV for GS

Source	DF	SS	MS	F	P
V002	1	3909.1	3909.14	2.68	0.1528
Error	6	8753.1	1458.86		
Total	7	12662.3			

Grand Mean 68.062 CV 56.12

V002 Mean

c 90.167

s 45.957

Observations per Mean 4

Standard Error of a Mean 19.097

Std Error (Diff of 2 Means) 27.008

Statistix 9.0 Galega Caso 1ª Colheita Orgão C ou S aplicação

Completely Randomized AOV for NR

Source	DF	SS	MS	F	P
V002	1	0.024	0.0235	0.00	0.9779
Error	6	169.864	28.3107		
Total	7	169.888			

Grand Mean 6.9795 CV 76.23

V002 Mean

c 7.0338

s 6.9253

Observations per Mean 4

Standard Error of a Mean 2.6604

Std Error (Diff of 2 Means) 3.7624

#### Completely Randomized AOV for GS

Source	DF	SS	MS	F	P
V002	1	13.931	13.9313	0.33	0.5838
Error	6	249.545	41.5909		
Total	7	263.477			

Grand Mean 42.351 CV 15.23

V002 Mean

c 43.670

s 41.031

Observations per Mean 4

Standard Error of a Mean 3.2245

Std Error (Diff of 2 Means) 4.5602

#### Statistix 9.0 Galega Caso 2ª Colheita Orgão C ou S aplicação

#### Completely Randomized AOV for NR

Source	DF	SS	MS	F	P
V002	1	1.103	1.103	0.01	0.9224
Error	6	640.970	106.828		
Total	7	642.073			

Grand Mean 24.492 CV 42.20

V002 Mean

c 24.863

s 24.120

Observations per Mean 4

Standard Error of a Mean 5.1679

Std Error (Diff of 2 Means) 7.3085

Completely Randomized AOV for GS

Source	DF	SS	MS	F	P
V002	1	223.429	223.429	1.79	0.2296

Error	6	749.474	124.912		
-------	---	---------	---------	--	--

Total	7	972.903			
-------	---	---------	--	--	--

Grand Mean 25.131 CV 44.47

V002 Mean

c 30.416

s 19.846

Observations per Mean 4

Standard Error of a Mean 5.5882

Std Error (Diff of 2 Means) 7.9029

Statistix 9.0 Galega Caso 3ª Colheita Orgão C ou S aplicação

Completely Randomized AOV for NR

Source	DF	SS	MS	F	P
V002	1	20.837	20.8367	0.59	0.4718

Error	6	212.172	35.3619		
-------	---	---------	---------	--	--

Total	7	233.008			
-------	---	---------	--	--	--

Grand Mean 8.4119 CV 70.69

V002 Mean

c 10.026

s 6.798

Observations per Mean 4

Standard Error of a Mean 2.9733

Std Error (Diff of 2 Means) 4.2049

Completely Randomized AOV for GS

Source	DF	SS	MS	F	P
V002	1	125.382	125.382	1.95	0.2116

Error	6	384.984	64.164		
-------	---	---------	--------	--	--

Total	7	510.365			
-------	---	---------	--	--	--

Grand Mean 45.496 CV 17.61

V002 Mean

c 41.537

s 49.454

Observations per Mean 4

Standard Error of a Mean 4.0051

Std Error (Diff of 2 Means) 5.6641

Statistix 9.0 Galega Caso 4ª Colheita Orgão C ou S aplicação

Completely Randomized AOV for NR

Source	DF	SS	MS	F	P
V002	1	12.6731	12.6731	3.36	0.1164
Error	6	22.6158	3.7693		
Total	7	35.2889			

Grand Mean 1.7226 CV 112.70

V002 Mean

c 2.9813

s 0.4640

Observations per Mean 4

Standard Error of a Mean 0.9707

Std Error (Diff of 2 Means) 1.3728

Completely Randomized AOV for GS

Source	DF	SS	MS	F	P
V002	1	26.452	26.4519	0.37	0.5656
Error	6	429.680	71.6133		
Total	7	456.132			

Grand Mean 53.479 CV 15.82

V002 Mean

c 51.660

s 55.297

Observations per Mean 4

Standard Error of a Mean 4.2312

Std Error (Diff of 2 Means) 5.9839

Statistix 9.0 Galega Caso 5ª Colheita Orgão C ou S aplicação

Completely Randomized AOV for NR

Source	DF	SS	MS	F	P
V002	1	0.01125	0.01125	0.24	0.6403
Error	6	0.27910	0.04652		
Total	7	0.29035			

Grand Mean 0.4248 CV 50.78

V002 Mean

c 0.3873

s 0.4623

Observations per Mean 4

Standard Error of a Mean 0.1078

Std Error (Diff of 2 Means) 0.1525

#### Completely Randomized AOV for GS

Source	DF	SS	MS	F	P
V002	1	1134.07	1134.07	2.67	0.1531
Error	6	2544.44	424.07		
Total	7	3678.51			

Grand Mean 60.008 CV 34.32

V002 Mean

c 48.102

s 71.914

Observations per Mean 4

Standard Error of a Mean 10.297

Std Error (Diff of 2 Means) 14.561

#### Statistix 9.0 Galega Caso 6ª Colheita Orgão C ou S aplicação

#### Completely Randomized AOV for NR

Source	DF	SS	MS	F	P
V002	1	0.36551	0.36551	0.48	0.5158
Error	6	4.60199	0.76700		
Total	7	4.96750			

Grand Mean 0.1660 CV 527.58

V002 Mean

c 0.3798

s -0.0478

Observations per Mean 4  
Standard Error of a Mean 0.4379  
Std Error (Diff of 2 Means) 0.6193

Completely Randomized AOV for GS

Source	DF	SS	MS	F	P
V002	1	221.5	221.49	0.14	0.7258
Error	6	9833.1	1638.86		
Total	7	10054.6			

Grand Mean 168.08 CV 24.09

V002 Mean

c 162.82

s 173.34

Observations per Mean 4  
Standard Error of a Mean 20.241  
Std Error (Diff of 2 Means) 28.626

Statistix 9.0 Galega Caso 1ª Colheita Raiz C ou S aplicação

Completely Randomized AOV for GS

Source	DF	SS	MS	F	P
V002	1	121.750	121.750	7.52	0.0337
Error	6	97.198	16.200		
Total	7	218.949			

Grand Mean 33.247 CV 12.11

V002 Mean

c 29.346

s 37.148

Observations per Mean 4  
Standard Error of a Mean 2.0124  
Std Error (Diff of 2 Means) 2.8460

Completely Randomized AOV for NR

Source	DF	SS	MS	F	P
V002	1	0.08323	0.08323	0.95	0.3684
Error	6	0.52819	0.08803		
Total	7	0.61143			

Grand Mean 0.4150 CV 71.49

V002 Mean

c 0.3130

s 0.5170

Observations per Mean 4

Standard Error of a Mean 0.1484

Std Error (Diff of 2 Means) 0.2098

Statistix 9.0 Galega Caso 1ª Colheita Raiz C ou S aplicação

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of GS by V002

V002 Mean Homogeneous Groups

s 37.148 A

c 29.346 B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 2.8460

Critical Q Value 3.461 Critical Value for Comparison 6.9646

All 2 means are significantly different from one another.

Statistix 9.0 Galega Caso 2ª Colheita raiz C ou S aplicação

Completely Randomized AOV for GS

Source	DF	SS	MS	F	P
V002	1	113.11	113.108	0.27	0.6194
Error	6	2476.98	412.830		
Total	7	2590.09			

Grand Mean 6.4004 CV 317.45

V002 Mean

c 10.161

s 2.640

Observations per Mean 4

Standard Error of a Mean 10.159

Std Error (Diff of 2 Means) 14.367

Completely Randomized AOV for NR

Source	DF	SS	MS	F	P
V002	1	174.74	174.742	1.00	0.3550



Error 6 1044.32 174.053  
Total 7 1219.06  
Grand Mean 7.7161 CV 170.98

V002 Mean

c 3.043

s 12.390

Observations per Mean 4

Standard Error of a Mean 6.5965

Std Error (Diff of 2 Means) 9.3288

Statistix 9.0 Galega Caso 3ª Colheita raiz C ou S aplicação

Completely Randomized AOV for GS

Source	DF	SS	MS	F	P
V002	1	510.98	510.977	2.65	0.1546

Error	6	1156.13	192.688
-------	---	---------	---------

Total	7	1667.11
-------	---	---------

Grand Mean 47.027 CV 29.52

V002 Mean

c 39.035

s 55.019

Observations per Mean 4

Standard Error of a Mean 6.9406

Std Error (Diff of 2 Means) 9.8155

Completely Randomized AOV for NR

Source	DF	SS	MS	F	P
V002	1	0.00231	0.00231	0.01	0.9089

Error	6	0.97304	0.16217
-------	---	---------	---------

Total	7	0.97535
-------	---	---------

Grand Mean 0.1717 CV 234.47

V002 Mean

c 0.1548

s 0.1887

Observations per Mean 4

Standard Error of a Mean 0.2014

Std Error (Diff of 2 Means) 0.2848

Statistix 9.0 Galega Caso 4ª Colheita raiz C ou S aplicação  
Completely Randomized AOV for GS

Source	DF	SS	MS	F	P
V002	1	2501.26	2501.26	2.36	0.1755
Error	6	6361.88	1060.31		
Total	7	8863.14			

Grand Mean 57.077 CV 57.05

V002 Mean

c 74.760

s 39.395

Observations per Mean 4

Standard Error of a Mean 16.281

Std Error (Diff of 2 Means) 23.025

Completely Randomized AOV for NR

Source	DF	SS	MS	F	P
V002	1	43.548	43.5478	1.79	0.2297
Error	6	146.167	24.3612		
Total	7	189.715			

Grand Mean 8.6386 CV 57.14

V002 Mean

c 10.972

s 6.306

Observations per Mean 4

Standard Error of a Mean 2.4679

Std Error (Diff of 2 Means) 3.4901

Statistix 9.0 Galega Caso 5ª Colheita raiz C ou S aplicação  
Completely Randomized AOV for GS

Source	DF	SS	MS	F	P
V002	1	13.228	13.2278	0.33	0.5864
Error	6	240.370	40.0617		
Total	7	253.598			

Grand Mean 20.890 CV 30.30

V002 Mean

c 19.605

s 22.176

Observations per Mean 4

Standard Error of a Mean 3.1647

Std Error (Diff of 2 Means) 4.4756

Completely Randomized AOV for NR

Source	DF	SS	MS	F	P
V002	1	9.040	9.0398	0.25	0.6325
Error	6	213.922	35.6537		
Total	7	222.962			

Grand Mean 13.961 CV 42.77

V002 Mean

c 12.898

s 15.023

Observations per Mean 4

Standard Error of a Mean 2.9855

Std Error (Diff of 2 Means) 4.2222

Statistix 9.0 Galega Caso 6ª Colheita raiz C ou S aplicação

Completely Randomized AOV for GS

Source	DF	SS	MS	F	P
V002	1	279.39	279.389	1.06	0.3419
Error	6	1574.14	262.357		
Total	7	1853.53			

Grand Mean 64.274 CV 25.20

V002 Mean

c 58.364

s 70.184

Observations per Mean 4

Standard Error of a Mean 8.0987

Std Error (Diff of 2 Means) 11.453

Completely Randomized AOV for NR

Source	DF	SS	MS	F	P
--------	----	----	----	---	---

V002 1 37.62 37.619 0.12 0.7373  
 Error 6 1827.52 304.586  
 Total 7 1865.14  
 Grand Mean 8.7420 CV 199.64  
 V002 Mean  
 c 10.910  
 s 6.574  
 Observations per Mean 4  
 Standard Error of a Mean 8.7262  
 Std Error (Diff of 2 Means) 12.341

Statistix 9.0 Folha C/ Cobrançosa Evolução Data  
 Completely Randomized AOV for NR

Source	DF	SS	MS	F	P
V002	3	137.429	45.8098	1.27	0.3489
Error	8	288.970	36.1212		
Total	11	426.399			

Grand Mean 8.6427 CV 69.54  
 V002 Mean  
 1 2.825  
 2 10.436  
 3 10.082  
 4 11.227  
 Observations per Mean 3  
 Standard Error of a Mean 3.4699  
 Std Error (Diff of 2 Means) 4.9072

Completely Randomized AOV for GS

Source	DF	SS	MS	F	P
V002	3	4318.46	1439.49	23.09	0.0003
Error	8	498.81	62.35		
Total	11	4817.27			

Grand Mean 55.386 CV 14.26  
 V002 Mean  
 1 43.906  
 2 34.057

3 59.252  
 4 84.331  
 Observations per Mean 3  
 Standard Error of a Mean 4.5589  
 Std Error (Diff of 2 Means) 6.4473

Statistix 9.0 Folha C/ Cobrançosa Evolução Data

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of GS by V002

V002 Mean Homogeneous Groups

4 84.331 A  
 3 59.252 B  
 1 43.906 BC  
 2 34.057 C

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 6.4473  
 Critical Q Value 4.527 Critical Value for Comparison 20.639  
 There are 3 groups (A, B, etc.) in which the means  
 are not significantly different from one another.

Statistix 9.0 Folha S/ Cobrançosa Evolução Data

Completely Randomized AOV for NR

Source	DF	SS	MS	F	P
V002	3	0.03243	0.01081	2.33	0.1508
Error	8	0.03713	0.00464		
Total	11	0.06956			

Grand Mean 0.0414 CV 164.50  
 V002 Mean  
 1 0.0000  
 2 0.0000  
 3 0.1273  
 4 0.0384

Observations per Mean 3  
 Standard Error of a Mean 0.0393  
 Std Error (Diff of 2 Means) 0.0556

Completely Randomized AOV for GS

Source	DF	SS	MS	F	P
V002	3	146.649	48.8832	0.77	0.5415
Error	8	506.659	63.3324		
Total	11	653.309			
Grand Mean	31.726	CV 25.08			

V002 Mean

1 27.446

2 31.595

3 37.158

4 30.704

Observations per Mean 3

Standard Error of a Mean 4.5946

Std Error (Diff of 2 Means) 6.4978

Statistix 9.0 Orgão C/ Cobrançosa Evolução Data

Completely Randomized AOV for NR

Source	DF	SS	MS	F	P
V002	3	89.428	29.8094	5.47	0.0244
Error	8	43.608	5.4510		
Total	11	133.036			
Grand Mean	4.7940	CV 48.70			

V002 Mean

1 2.7007

2 8.8313

3 5.7243

4 1.9197

Observations per Mean 3

Standard Error of a Mean 1.3480

Std Error (Diff of 2 Means) 1.9063

Completely Randomized AOV for GS

Source	DF	SS	MS	F	P
V002	3	7082.46	2360.82	76.23	0.0000
Error	8	247.75	30.97		
Total	11	7330.21			
Grand Mean	38.060	CV 14.62			

V002 Mean

1 29.269

2 13.314

3 31.281

4 78.374

Observations per Mean 3

Standard Error of a Mean 3.2129

Std Error (Diff of 2 Means) 4.5438

Statistix 9.0 Orgão C/ Cobrançosa Evolução Data

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of NR by V002

V002 Mean Homogeneous Groups

2 8.8313 A

3 5.7243 AB

1 2.7007 B

4 1.9197 B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 1.9063

Critical Q Value 4.527 Critical Value for Comparison 6.1025

There are 2 groups (A and B) in which the means  
are not significantly different from one another.

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of GS by V002

V002 Mean Homogeneous Groups

4 78.374 A

3 31.281 B

1 29.269 B

2 13.314 C

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 4.5438

Critical Q Value 4.527 Critical Value for Comparison 14.545

There are 3 groups (A, B, etc.) in which the means  
are not significantly different from one another.

Statistix 9.0 Orgão S/ Cobrançosa Evolução Data

Completely Randomized AOV for NR

Source	DF	SS	MS	F	P
V002	3	0.00399	0.00133	14.91	0.0012
Error	8	0.00071	0.00009		
Total	11	0.00470			
Grand Mean	0.0138	CV 68.53			

V002 Mean

1 0.0000

2 0.0000

3 0.0107

4 0.0444

Observations per Mean 3

Standard Error of a Mean 5.451E-03

Std Error (Diff of 2 Means) 7.708E-03

Completely Randomized AOV for GS

Source	DF	SS	MS	F	P
V002	3	1021.69	340.562	31.77	0.0001
Error	8	85.77	10.721		
Total	11	1107.45			
Grand Mean	22.536	CV 14.53			

V002 Mean

1 17.024

2 15.579

3 19.176

4 38.363

Observations per Mean 3

Standard Error of a Mean 1.8904

Std Error (Diff of 2 Means) 2.6734

Statistix 9.0 Orgão S COB Evolução Data

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of NR by V002

V002 Mean Homogeneous Groups

4 0.0444 A

3 0.0107 B

1 0.0000 B

2 0.0000 B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 7.708E-03



Critical Q Value 4.527 Critical Value for Comparison 0.0247

There are 2 groups (A and B) in which the means  
are not significantly different from one another.

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of GS by V002

V002 Mean Homogeneous Groups

4 38.363 A

3 19.176 B

1 17.024 B

2 15.579 B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 2.6734

Critical Q Value 4.527 Critical Value for Comparison 8.5582

There are 2 groups (A and B) in which the means  
are not significantly different from one another.

Statistix 9.0 Raiz C/ Cobrançosa Evolução Data

Completely Randomized AOV for NR

Source	DF	SS	MS	F	P
--------	----	----	----	---	---

V002	3	18.9276	6.30919	1.46	0.2956
------	---	---------	---------	------	--------

Error	8	34.4753	4.30941		
-------	---	---------	---------	--	--

Total	11	53.4028			
-------	----	---------	--	--	--

Grand Mean 1.5157 CV 136.96

V002 Mean

1 0.1713

2 1.2553

3 1.0637

4 3.5723

Observations per Mean 3

Standard Error of a Mean 1.1985

Std Error (Diff of 2 Means) 1.6950

Completely Randomized AOV for GS

Source	DF	SS	MS	F	P
--------	----	----	----	---	---

V002	3	6147.90	2049.30	12.92	0.0020
------	---	---------	---------	-------	--------

Error	8	1269.36	158.67		
-------	---	---------	--------	--	--

Total 11 7417.26  
 Grand Mean 45.057 CV 27.96  
 V002 Mean  
 1 43.303  
 2 11.059  
 3 74.142  
 4 51.724  
 Observations per Mean 3  
 Standard Error of a Mean 7.2726  
 Std Error (Diff of 2 Means) 10.285

Statistix 9.0 Raiz C/ Cobrançosa Evolução Data

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of GS by V002

V002 Mean Homogeneous Groups

3 74.142 A  
 4 51.724 A  
 1 43.303 AB  
 2 11.059 B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 10.285  
 Critical Q Value 4.527 Critical Value for Comparison 32.924  
 There are 2 groups (A and B) in which the means  
 are not significantly different from one another.

Statistix 9.0 Raiz S/ Cobrançosa Evolução Data

Completely Randomized AOV for NR

Source	DF	SS	MS	F	P
V002	3	4.520E-04	1.507E-04	3.10	0.0891
Error	8	3.887E-04	4.858E-05		
Total	11	8.407E-04			

Grand Mean 5.67E-03 CV 123.00  
 V002 Mean  
 1 0.0000  
 2 0.0000  
 3 8.00E-03  
 4 0.0147

Observations per Mean        3  
 Standard Error of a Mean    4.024E-03  
 Std Error (Diff of 2 Means) 5.691E-03

Completely Randomized AOV for GS

Source	DF	SS	MS	F	P
V002	3	57.075	19.0249	1.05	0.4216
Error	8	144.817	18.1021		
Total	11	201.892			

Grand Mean 20.146    CV 21.12

V002    Mean

- 1 23.375
- 2 20.839
- 3 18.646
- 4 17.724

Observations per Mean        3  
 Standard Error of a Mean    2.4564  
 Std Error (Diff of 2 Means) 3.4739

Statistix 9.0 Cobrançosa Caso 1ª Colheita Folha C/ ou S/ aplicação  
 Completely Randomized AOV for GS

Source	DF	SS	MS	F	P
V002	1	406.397	406.397	5.59	0.0773
Error	4	290.707	72.677		
Total	5	697.104			

Grand Mean 35.676    CV 23.90

V002    Mean

- c 43.906
- s 27.446

Observations per Mean        3  
 Standard Error of a Mean    4.9219  
 Std Error (Diff of 2 Means) 6.9607

Completely Randomized AOV for NR

Source	DF	SS	MS	F	P
V002	1	11.9738	11.9738	2.40	0.1966

Error 4 19.9926 4.9981  
Total 5 31.9663  
Grand Mean 1.4127 CV 158.26

V002 Mean

c 2.8253

s 0.0000

Observations per Mean 3

Standard Error of a Mean 1.2908

Std Error (Diff of 2 Means) 1.8254

Statistix 9.0 Cobrançosa Caso 2ª Colheita Folha C/ ou S/ aplicação

Completely Randomized AOV for GS

Source	DF	SS	MS	F	P
V002	1	9.092	9.0922	0.14	0.7301

Error	4	265.632	66.4080
-------	---	---------	---------

Total	5	274.724
-------	---	---------

Grand Mean 32.826 CV 24.83

V002 Mean

c 34.057

s 31.595

Observations per Mean 3

Standard Error of a Mean 4.7049

Std Error (Diff of 2 Means) 6.6537

Completely Randomized AOV for NR

Source	DF	SS	MS	F	P
V002	1	163.376	163.376	3.70	0.1268

Error	4	176.650	44.162
-------	---	---------	--------

Total	5	340.025
-------	---	---------

Grand Mean 5.2182 CV 127.35

V002 Mean

c 10.436

s 0.0000

Observations per Mean 3

Standard Error of a Mean 3.8368

Std Error (Diff of 2 Means) 5.4260

Statistix 9.0 Cobrançosa Caso 3ª Colheita Folha C/ ou S/ aplicação  
Completely Randomized AOV for GS

Source	DF	SS	MS	F	P
V002	1	732.217	732.217	16.32	0.0156
Error	4	179.504	44.876		
Total	5	911.721			

Grand Mean 48.205 CV 13.90

V002 Mean

c 59.252

s 37.158

Observations per Mean 3

Standard Error of a Mean 3.8676

Std Error (Diff of 2 Means) 5.4697

Completely Randomized AOV for NR

Source	DF	SS	MS	F	P
V002	1	148.633	148.633	8.18	0.0459
Error	4	72.675	18.169		
Total	5	221.308			

Grand Mean 5.1045 CV 83.50

V002 Mean

c 10.082

s 0.127

Observations per Mean 3

Standard Error of a Mean 2.4609

Std Error (Diff of 2 Means) 3.4803

Statistix 9.0 Cobrançosa Caso 3ª Colheita Folha C/ ou S/ aplicação

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of GS by V002

V002 Mean Homogeneous Groups

c 59.252 A

s 37.158 B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 5.4697

Critical Q Value 3.930 Critical Value for Comparison 15.201

All 2 means are significantly different from one another.

#### Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of NR by V002

V002 Mean Homogeneous Groups

c 10.082 A

s 0.1273 B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 3.4803

Critical Q Value 3.930 Critical Value for Comparison 9.6724

All 2 means are significantly different from one another.

#### Statistix 9.0 Cobrançosa Caso 4ª Colheita Folha C/ ou S/ aplicação

##### Completely Randomized AOV for GS

Source	DF	SS	MS	F	P
V002	1	4313.78	4313.78	64.00	0.0013

Error	4	269.61	67.40
-------	---	--------	-------

Total	5	4583.39
-------	---	---------

Grand Mean 57.518 CV 14.27

V002 Mean

c 84.331

s 30.704

Observations per Mean 3

Standard Error of a Mean 4.7400

Std Error (Diff of 2 Means) 6.7034

##### Completely Randomized AOV for NR

Source	DF	SS	MS	F	P
V002	1	187.791	187.791	38.15	0.0035

Error	4	19.690	4.922
-------	---	--------	-------

Total	5	207.480
-------	---	---------

Grand Mean 5.6328 CV 39.39

V002 Mean

c 11.227

s 0.038

Observations per Mean 3

Standard Error of a Mean 1.2809

Std Error (Diff of 2 Means) 1.8115

Statistix 9.0 Cobrançosa Caso 4ª Colheita Folha C/ ou S/ aplicação

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of GS by V002

V002 Mean Homogeneous Groups

c 84.331 A

s 30.704 B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 6.7034

Critical Q Value 3.930 Critical Value for Comparison 18.630

All 2 means are significantly different from one another.

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of NR by V002

V002 Mean Homogeneous Groups

c 11.227 A

s 0.0383 B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 1.8115

Critical Q Value 3.930 Critical Value for Comparison 5.0346

All 2 means are significantly different from one another.

Statistix 9.0 Cobrançosa Caso 1ª Colheita Orgão C/ ou S/ aplicação

Completely Randomized AOV for GS

Source	DF	SS	MS	F	P
V002	1	224.886	224.886	5.83	0.0732

Error	4	154.333	38.583		
-------	---	---------	--------	--	--

Total	5	379.218			
-------	---	---------	--	--	--

Grand Mean 23.147 CV 26.84

V002 Mean

c 29.269

s 17.024

Observations per Mean 3

Standard Error of a Mean 3.5862

Std Error (Diff of 2 Means) 5.0717

Completely Randomized AOV for NR

Source	DF	SS	MS	F	P
V002	1	10.9404	10.9404	284.25	0.0001
Error	4	0.1540	0.0385		
Total	5	11.0944			

Grand Mean 1.3503 CV 14.53

V002 Mean

c 2.7007

s 0.0000

Observations per Mean 3

Standard Error of a Mean 0.1133

Std Error (Diff of 2 Means) 0.1602

Statistix 9.0 Cobrançosa Caso 1ª Colheita Orgão C ou S aplicação

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of NR by V002

V002 Mean Homogeneous Groups

c 2.7007 A

s 0.0000 B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.1602

Critical Q Value 3.930 Critical Value for Comparison 0.4452

All 2 means are significantly different from one another.

Statistix 9.0 Cobrançosa Caso 2ª Colheita Orgão C/ ou S/ aplicação

Completely Randomized AOV for GS

Source	DF	SS	MS	F	P
V002	1	7.6953	7.69534	1.65	0.2682
Error	4	18.6490	4.66225		
Total	5	26.3443			

Grand Mean 14.447 CV 14.95

V002 Mean

c 13.314

s 15.579

Observations per Mean 3

Standard Error of a Mean 1.2466

Std Error (Diff of 2 Means) 1.7630



Completely Randomized AOV for NR

Source	DF	SS	MS	F	P
V002	1	116.989	116.989	14.42	0.0191
Error	4	32.444	8.111		
Total	5	149.433			

Grand Mean 4.4157 CV 64.50

V002 Mean

c 8.8313

s 0.0000

Observations per Mean 3

Standard Error of a Mean 1.6443

Std Error (Diff of 2 Means) 2.3254

Statistix 9.0 Cobrançosa Caso 2ª Colheita Orgão C/ ou S/ aplicação

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of NR by V002

V002 Mean Homogeneous Groups

c 8.8313 A

s 0.0000 B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 2.3254

Critical Q Value 3.930 Critical Value for Comparison 6.4627

All 2 means are significantly different from one another.

Statistix 9.0 Cobrançosa Caso 3ª Colheita Orgão C/ ou S/ aplicação

Completely Randomized AOV for GS

Source	DF	SS	MS	F	P
V002	1	219.809	219.809	14.30	0.0194
Error	4	61.503	15.376		
Total	5	281.312			

Grand Mean 25.229 CV 15.54

V002 Mean

c 31.281

s 19.176

Observations per Mean 3

Standard Error of a Mean 2.2639

Std Error (Diff of 2 Means) 3.2016

Completely Randomized AOV for NR

Source	DF	SS	MS	F	P
V002	1	48.9690	48.9690	92.67	0.0007

Error	4	2.1137	0.5284		
-------	---	--------	--------	--	--

Total	5	51.0827			
-------	---	---------	--	--	--

Grand Mean 2.8675 CV 25.35

V002 Mean

c 5.7243

s 0.0107

Observations per Mean 3

Standard Error of a Mean 0.4197

Std Error (Diff of 2 Means) 0.5935

Statistix 9.0 Cobrançosa Caso 3ª Colheita Orgão C/ ou S/ aplicação

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of GS by V002

V002 Mean Homogeneous Groups

c 31.281 A

s 19.176 B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 3.2016

Critical Q Value 3.930 Critical Value for Comparison 8.8980

All 2 means are significantly different from one another.

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of NR by V002

V002 Mean Homogeneous Groups

c 5.7243 A

s 0.0107 B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.5935

Critical Q Value 3.930 Critical Value for Comparison 1.6496

All 2 means are significantly different from one another.

Statistix 9.0 Cobrançosa Caso 4ª Colheita Orgão C/ ou S/ aplicação

Completely Randomized AOV for GS

Source	DF	SS	MS	F	P
--------	----	----	----	---	---

V002 1 2401.32 2401.32 96.99 0.0006

Error 4 99.03 24.76

Total 5 2500.35

Grand Mean 58.369 CV 8.52

V002 Mean

c 78.374

s 38.363

Observations per Mean 3

Standard Error of a Mean 2.8727

Std Error (Diff of 2 Means) 4.0626

Completely Randomized AOV for NR

Source	DF	SS	MS	F	P
--------	----	----	----	---	---

V002	1	5.2753	5.27531	2.37	0.1984
------	---	--------	---------	------	--------

Error	4	8.8971	2.22428		
-------	---	--------	---------	--	--

Total	5	14.1724			
-------	---	---------	--	--	--

Grand Mean 0.9820 CV 151.87

V002 Mean

c 1.9197

s 0.0443

Observations per Mean 3

Standard Error of a Mean 0.8611

Std Error (Diff of 2 Means) 1.2177

Statistix 9.0 Cobrançosa Caso 4ª Colheita Orgão C/ ou S/ aplicação

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of GS by V002

V002 Mean Homogeneous Groups

c 78.374 A

s 38.363 B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 4.0626

Critical Q Value 3.930 Critical Value for Comparison 11.291

All 2 means are significantly different from one another.

Statistix 9.0 Cobrançosa Caso 1ª Colheita Raiz C/ ou S/ aplicação

Completely Randomized AOV for GS

Source	DF	SS	MS	F	P
--------	----	----	----	---	---

V002 1 595.688 595.688 6.13 0.0685  
 Error 4 388.472 97.118  
 Total 5 984.160  
 Grand Mean 33.339 CV 29.56  
 V002 Mean  
   c 43.303  
   s 23.375  
 Observations per Mean 3  
 Standard Error of a Mean 5.6897  
 Std Error (Diff of 2 Means) 8.0464

#### Completely Randomized AOV for NR

Source	DF	SS	MS	F	P
V002	1	0.04403	0.04403	75.83	0.0010
Error	4	0.00232	0.00058		
Total	5	0.04636			

Grand Mean 0.0857 CV 28.13  
 V002 Mean  
   c 0.1713  
   s 0.0000  
 Observations per Mean 3  
 Standard Error of a Mean 0.0139  
 Std Error (Diff of 2 Means) 0.0197

#### Statistix 9.0 Cobrançosa Caso 1ª Colheita Raiz C/ ou S/ aplicação

##### Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of NR by V002

V002 Mean Homogeneous Groups

c 0.1713 A  
 s 0.0000 B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0197

Critical Q Value 3.930 Critical Value for Comparison 0.0547

All 2 means are significantly different from one another.

#### Statistix 9.0 Cobrançosa Caso 2ª Colheita Raiz C/ ou S/ aplicação

##### Completely Randomized AOV for GS

Source	DF	SS	MS	F	P
V002	1	143.453	143.453	4.43	0.1032
Error	4	129.668	32.417		
Total	5	273.121			

Grand Mean 15.949 CV 35.70

V002 Mean

c 11.059

s 20.839

Observations per Mean 3

Standard Error of a Mean 3.2872

Std Error (Diff of 2 Means) 4.6488

Completely Randomized AOV for NR

Source	DF	SS	MS	F	P
V002	1	2.36379	2.36379	1.57	0.2780
Error	4	6.00912	1.50228		
Total	5	8.37291			

Grand Mean 0.6277 CV 195.27

V002 Mean

c 1.2553

s 0.0000

Observations per Mean 3

Standard Error of a Mean 0.7076

Std Error (Diff of 2 Means) 1.0008

Statistix 9.0 Cobrançosa Caso 3ª Colheita Raiz C/ ou S/ aplicação

Completely Randomized AOV for GS

Source	DF	SS	MS	F	P
V002	1	4619.76	4619.76	37.82	0.0035
Error	4	488.58	122.14		
Total	5	5108.34			

Grand Mean 46.394 CV 23.82

V002 Mean

c 74.142

s 18.646

Observations per Mean        3  
 Standard Error of a Mean    6.3808  
 Std Error (Diff of 2 Means) 9.0238  
 Completely Randomized AOV for NR  

Source	DF	SS	MS	F	P
V002	1	1.67165	1.67165	1.92	0.2380
Error	4	3.47991	0.86998		
Total	5	5.15156			

 Grand Mean 0.5358    CV 174.07  
 V002    Mean  
       c 1.0637  
       s 0.0080

Observations per Mean        3  
 Standard Error of a Mean    0.5385  
 Std Error (Diff of 2 Means) 0.7616

Statistix 9.0 Cobrançosa Caso 3ª Colheita Raiz C/ ou S/ aplicação

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of GS by V002

V002    Mean    Homogeneous Groups

c    74.142    A

s    18.646    B

Alpha        0.05    Standard Error for Comparison 9.0238

Critical Q Value 3.930    Critical Value for Comparison 25.079

All 2 means are significantly different from one another.

Statistix 9.0 Cobrançosa Caso 4ª Colheita Raiz C/ ou S/ aplicação

Completely Randomized AOV for GS

Source	DF	SS	MS	F	P
V002	1	1734.00	1734.00	17.02	0.0145
Error	4	407.46	101.87		
Total	5	2141.46			

Grand Mean 34.724    CV 29.07  
 V002    Mean  
       c 51.724  
       s 17.724

Observations per Mean        3

Standard Error of a Mean 5.8271

Std Error (Diff of 2 Means) 8.2408

Completely Randomized AOV for NR

Source	DF	SS	MS	F	P
V002	1	18.9855	18.9855	3.04	0.1562

Error	4	24.9843	6.2461		
-------	---	---------	--------	--	--

Total	5	43.9698			
-------	---	---------	--	--	--

Grand Mean 1.7935 CV 139.35

V002 Mean

c 3.5723

s 0.0147

Observations per Mean 3

Standard Error of a Mean 1.4429

Std Error (Diff of 2 Means) 2.0406

Statistix 9.0 Cobrançosa Caso 4ª Colheita Raiz C/ ou S/ aplicação

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of GS by V002

V002 Mean Homogeneous Groups

c 51.724 A

s 17.724 B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 8.2408

Critical Q Value 3.930 Critical Value for Comparison 22.903

All 2 means are significantly different from one another.

## Anexo II

(Escala de classificação BBCH dos estados fenológicos da oliveira (adaptada por Sanz-Cortés *et al.*, 2002))

Descrição dos estados fenológicos da escala BBCH da oliveira (Sanz-Cortés *et al.*, 2002):

Estado principal de crescimento 0: desenvolvimento das gemas

00 – As gemas situadas no ápice dos lançamentos do ano anterior estão completamente fechadas e são pontiagudas, sem pedúnculo e de cor ocre.

01 – As gemas foliares começam a inchar e a abrir, sendo visíveis os novos primórdios foliares.

03 – As gemas foliares alargam e separam-se da base.

07 – As pequenas folhas exteriores abrem-se sem se separar do todo, permanecendo os extremos apicais unidos.

09 – As pequenas folhas exteriores separam-se e as pontas ficam entre-cruzadas.

Estado principal de crescimento 1: desenvolvimento das folhas

11 – As primeiras folhas separam-se do todo e têm uma cor verde acinzentada.

15 – Outras folhas se separam, mas sem alcançar o tamanho final. As primeiras folhas adquirem uma tonalidade verde nas pontas.

19 – As folhas alcançam o tamanho e a forma típica da variedade.

Estado principal de crescimento 3: desenvolvimento dos lançamentos

31 – Os lançamentos alcançam 10 % do seu tamanho final.

33 – Os lançamentos alcançam 30 % do seu tamanho final.

37 – Os lançamentos alcançam 70 % do seu tamanho final.

Estado principal de crescimento 5: desenvolvimento das inflorescências

50 – As gemas florais, situadas nas axilas das folhas, estão completamente fechadas e são pontiagudas, sem pedúnculo e com brácteas de cor ocre.

51 – As gemas florais começam a inchar e separam-se da base mediante um pedúnculo.

53 – As gemas florais abrem e começa o desenvolvimento do rácimo floral. Anexos 98

54 – Os verticilos do rácimo floral começam a alargar-se.

55 – Rácimo floral totalmente expandido e os botões florais começam a abrir.

57 – A corola, de cor verde, é maior que o cálice.

59 – A corola muda de cor verde para branco.

Estado principal de crescimento 6: floração

60 – Abertura das primeiras flores.

61 – Começo da floração: cerca de 10 % das flores estão abertas.

65 – Plena floração: pelo menos 50 % das flores estão abertas.

67 – As pétalas brancas começam a cair.

68 – A maioria das pétalas caiu ou estão manchadas.

69 – Fim da floração, vingamento dos frutos e abscisão dos ovários não fecundados.

Estado principal de crescimento 7: desenvolvimento dos frutos

71 – Frutos com aproximadamente 10 % do seu tamanho final.

75 – Frutos com aproximadamente 50 % do seu tamanho final. Inicia-se o endurecimento do endocarpo (o fruto apresenta resistência ao corte).

79 – Frutos com aproximadamente 90 % do seu tamanho final e estão aptos para a colheita em verde.

Estado principal de crescimento 8: Maturação dos frutos

80 – O verde intenso dos frutos muda para verde claro ou amarelado.

81 – Começa a coloração dos frutos.



85 – Aumenta a coloração específica dos frutos.

89 – Os frutos adquirem a cor específica da variedade, permanecendo túrgidos e estão aptos para a extracção de azeite.

Estado principal de crescimento 9: Senescência

92 – Os frutos perdem a turgescência e começam a cair